
**“COMPLEJOS BINARIOS Y TERNARIOS DE
FÁRMACOS HIDROFÓBICOS MODELO
INCORPORADOS A SISTEMAS
NANOESTRUCTURADOS: CARACTERIZACIÓN
FISICOQUÍMICA Y BIOFARMACÉUTICA”**

Tesis de Doctorado Cooperativo

Lic. Carolina Aloisio

-2014-

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas

El trabajo de tesis de doctorado cooperativo fue realizado en las siguientes instituciones:

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba.

Departamento de Fármacos y Medicamentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Araraquara, SP- Brasil

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Marcela R. Longhi

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, UNITEFA-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Departamento de Fármacos y Medicamentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Araraquara, SP- Brasil

COMISIÓN EVALUADORA:

Dra. Elba I. Buján

Dr. Santiago Palma

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Dra. Palmira Daflón Gramiã

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho”, Araraquara, SP- Brasil.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mis agradecimientos a la Dra. Longhi, por brindarme la oportunidad de descubrir el interesante mundo de la investigación, por guiarme en él, por todas sus enseñanzas, por confiar en mí y por apoyarme siempre en mis decisiones académicas. Al profesor Anselmo Gomes de Oliviera y a la profesora Palmira Daflón Gremião por recibirme en su universidad, siempre de brazos abiertos, por hacerme sentir como una alumna más y por su ayuda, no sólo académica, sino también en otras situaciones en las que demostraron su excelente calidad humana. Agradezco a los miembros de la comisión de tesis, la Dra. Elba Buján y el Dr. Santiago Palma por sus importantes aportes en este trabajo de tesis a lo largo de todo mi doctorado y sobre todo por haberse dedicado a leerla y corregir el manuscrito final. A la Dra. Sophia Antimisiaris, por recibirme en su laboratorio en la Universidad de Patras, Grecia y por todos los conocimientos que me impartió.

Agradezco a CONICET, FONCyT, SECyT, al Programa de Centros Asociados CAPES/SPU y Programa "EuroTANGO II", Erasmus Mundus Action 2-Strand 1 por las becas y/o subsidios, y a la Dra. Susana Rubiales y a las Pro-secretarías de Relaciones Internacionales de la Universidad Nacional de Córdoba y de la Universidad de Patras por sus gestiones, que hicieron posibles la realización de este doctorado cooperativo y de mi Doctorado Sandwich en Patras, Grecia.

A las chicas del laboratorio:

A Clau, Ari, Vicky, Lichi y Juli M, quienes realizaron grandes contribuciones a esta tesis, gracias a su constante ayuda, acompañándome cuando necesité una mano con una metodología, equipo, procesamiento de datos.

A Renée, Jime y Noel U. que además de ayudarme siempre con lo que necesite, fueron grandes amigos en lo personal, acompañándome en momentos felices y no tan felices.

Juli A., Romi, Vane y Cintia, quienes se incorporaron recientemente, les agradezco por los aires renovadores y juveniles que aportan y les deseo lo mejor en el comienzo y a lo largo de sus carreras.

A mis compañeras de docencia de Análisis Farmacéutico I, por su constante ayuda y por adaptarse año a año a mis complicaciones respecto a fechas de dictado de clases, permitiéndome ejercer la docencia sin interferir en mis viajes.

A los chicos de los laboratorios 202 y 215 por ayudarnos siempre en lo que necesitemos y también por otros momentos extracadémicos compartidos.

Al resto de los miembros del departamento de Farmacia de la UNC, por su constante colaboración y ayuda.

A los chicos y chicas del laboratorio de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia de la UNESP (Araraquara, Brasil), a los que me brindaron su ayuda y me recibieron como una compañera más, y a todas las personas que conocí en Araraquara y me enriquecieron con su hermosa cultura.

A Hilris, Fer, Lucas, Carol y Marcia, quienes me brindaron su amistad más allá de las distancias culturales y geográficas, y fueron un gran apoyo y compañía en mis permanencias en Araraquara.

A mis compañeros de la residencia de Kastelokampos, en Patras, Grecia, por su compañía y por enriquecerme con sus diferentes culturas. A Tomás, Ana, Pablo, Diana, Nick y Taila por muchos momentos y viajes compartidos, y por ser un gran apoyo a lo largo de mi estadía en Patras. A mis compañeros del laboratorio de la Universidad de Patras por su ayuda, especialmente a Ahmed quien me brindó su amistad, me enriqueció con su cultura y me ayudó mucho durante mi período en la Universidad.

A mis amigas de la vida...

de la facultad: Jime, Coty, Naty D., Nati W., Clau, Sofi, Luchi (e Isa) y Ceci, por estar siempre, apoyarme en todo, compartir intereses tanto personales como profesionales... También, agradezco a Denis, Maxi, Sole, Iván, Damián, Pablo y Adrián, por lindos momentos y por la buena onda de siempre.

A mis amigas de Almafuerde: Lauri, Mari, Flor, Yoha, Xime, Beti, Vivi (Lola y Emi) y Jor, por tantos momentos compartidos, porque a pesar de que vamos creciendo con diferentes rumbos seguimos estando juntas...

A Lucho, gracias por estar, por apoyarme y bancarme en la etapa final de la tesis, por ser tan compañero y por quererme...

A mi hermana, Meli, y a Manu por su apoyo constante, sus consejos y paciencia....

A mis abuelos y al tío Pepe, que me criaron y malcriaron, siempre con cariño....

A mis tíos y primos mendocinos, que a pesar de la distancia siempre se los siente presentes....

Mi más especial agradecimiento es para mis padres, Patri y Pablo, por los valores que me impartieron, que hicieron de mí quien soy hoy y me enseñaron desde muy chiquita que la formación educativa es la principal herramienta para crecer y realizarse.

¡Los quiero mucho!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS	11
CAPÍTULO I:INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	15
1.1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1.1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB)	17
1.1.2. Ingredientes farmacéuticos activos (IFA)	18
1.1.3. Sistemas portadores de fármacos a partir de complejos moleculares	20
1.1.4. Sistemas portadores de fármacos nanoestructurados	21
1.2. OBJETIVOS.....	23
1.2.1. Objetivos generales	23
1.2.2. Objetivos específicos	23
1.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO II: COMPLEJOS BINARIOS Y TERNARIOS	29
2.1. INTRODUCCIÓN.....	31
2.1.1. Encapsulación monomolecular	31
2.1.1.1. Complejos de inclusión con ciclodextrinas	31
2.1.1.1.1. Derivados de ciclodextrinas	33
2.1.1.1.2. Formación de complejos fármaco-ciclodextrina	33
2.1.1.1.3. Análisis de Solubilidad de Fases (ASF)	33
2.1.1.1.4. Estimación de la Constante de Formación	35
2.1.1.2. Formación de sales	36
2.1.1.2.1. Meglumina (MEG)	36
2.1.2. Complejos multicomponente	36
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.2.1. MATERIALES	39
2.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	39
2.2.2.1. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN	39
2.2.2.1.1. Análisis de solubilidad de fases (ASF)	39
2.2.2.1.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN- ¹ H)	40
2.2.2.2. ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO	41
2.2.2.2.1. Preparación de las muestras sólidas	41
2.2.2.2.2. Espectrometría Infrarroja (IR)	41
2.2.2.2.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA)	41
2.2.2.2.4. Difracción de Rayos X (DRX)	42

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
2.3.1. COMPLEJOS BINARIOS CON CICLODEXTRINAS Y MEGLUMINA	43
2.3.1.1. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN	43
2.3.1.1.1. Análisis de solubilidad de fases (ASF)	43
2.3.1.1.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN- ¹ H) y ROESY.	47
2.3.1.2. ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO	53
2.3.1.2.1. Espectrometría Infrarroja (IR)	53
2.3.1.2.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Análisis Termogravimétrico Diferencial (DTG).	56
2.3.1.2.3. Difracción de Rayos X (DRX)	63
2.3.2. COMPLEJOS TERNARIOS	67
2.3.2.1. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN	67
2.3.2.1.1. Análisis de solubilidad de fases (ASF)	67
2.3.2.1.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN- ¹ H).	70
2.3.2.2. ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO	74
2.3.2.2.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Análisis Termogravimétrico Diferencial (DTG).	74
2.3.2.2.2. Espectrometría Infrarroja (IR)	76
2.3.2.2.3. Difracción de Rayos X (DRX).	78
2.4. CONCLUSIONES PARCIALES	81
2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CAPÍTULO III: MICROEMULSIONES	87
3.1. INTRODUCCIÓN	89
3.1.1. MICROEMULSIONES (ME)	89
3.1.2. Microemulsiones de uso farmacéutico	90
3.1.3. Componentes de microemulsiones	90
3.1.4. Microemulsiones modificadas mediante la adición de ligandos	91
3.1.5. Metodología de caracterización de microemulsiones	92
3.1.5.1. Diagrama Pseudo-ternarios de Fases	92
3.1.5.2. Microscopía de Luz Polarizada	93
3.1.5.3. Conductividad (σ)	93
3.1.5.4. Diámetro de partículas	94
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
3.2.1. MATERIALES	97
3.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	97
3.2.2.1. Diagrama pseudo-ternario de Fases (DPF).	97

3.2.2.2. Microscopía de Luz polarizada (MLP).	98
3.2.2.4. Conductividad (σ)	98
3.2.2.5. Determinación del coeficiente de partición (P)	99
3.2.2.6. Estudios de incorporación de fármacos en microemulsiones	99
3.2.2.7. Determinación del modo de interacción fármaco-componentes.	100
3.2.2.8. Determinación del tamaño de partículas, índice de polidispersidad y potencial zeta.	101
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
3.3.1. MICROEMULSIONES	103
3.3.1.1. Diagrama pseudo-ternario de Fases (DPF).	103
3.3.1.2. Microscopía de Luz polarizada (MLP).	104
3.3.1.3. Conductividad (σ)	105
3.3.1.4. Determinación de los coeficientes de partición (P)	105
3.3.1.5. Estudios de incorporación de fármacos en microemulsiones	107
3.3.1.6. Determinación del modo de interacción fármaco-componentes.	108
3.3.1.7. Determinación del Tamaño de partículas (DLS) y potencial zeta	110
3.3.2. MICROEMULSIONES CONTENIENDO LIGANDOS	113
3.3.2.1. Diagrama pseudo-ternario de Fases (DPF)	113
3.3.2.2. Conductividad (σ)	113
3.3.2.2. Efecto de la proporción O/S en la solubilidad aparente de los fármacos dentro de ME conteniendo ligandos	115
3.3.2.3. Determinación del modo de interacción fármaco-componentes.	117
3.3.2.4. Determinación del tamaño de partículas, polidispersidad y potencial zeta	120
3.4. CONCLUSIONES PARCIALES	123
3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
CAPÍTULO IV: LIPOSOMAS.....	129
4.1. INTRODUCCIÓN.....	131
4.1.1. Sistemas de vehiculización de fármacos nanoestructurados	131
4.1.2. Liposomas	131
4.1.3. Estructura, tamaño y carga de liposomas.	132
4.1.4. Fármaco-en-ciclodextrinas-en-liposomas (FCL)	134
4.1.5. Metodologías de obtención de liposomas.	135
4.1.5.1. Metodología de hidratación de capa delgada (HCD)	135
4.1.5.2. Metodología de obtención de vesículas secas reconstituídas (DRV)	136
4.1.6. Metodologías de caracterización de liposomas.	137
4.1.6.1. Determinación del tamaño de partículas	137
4.1.6.2. Potencial zeta	137

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	139
4.2.1. MATERIALES	139
4.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	139
4.2.2.1. Preparación de liposomas	139
4.2.2.1.1. Método de hidratación de capa delgada (HCD)	139
4.2.2.1.2. Método de obtención de vesículas deshidratadas reconstituídas (DRV)	139
4.2.2.2. Determinación del tamaño de partículas, índice de polidispersidad y potencial zeta	140
4.2.2.3. Determinación del modo de interacción fármaco-componentes.	140
4.2.2.4. Metodología para la determinación de la integridad de liposomas	141
4.2.2.5. Estudios de eficiencia de encapsulación	141
4.2.2.5.1. Ensayo colorimétrico de Stewart	141
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	143
4.3.1. Determinación de tamaño de partículas, índice de polidispersidad y potencial zeta	143
4.3.2. Determinación del modo de interacción fármaco-componentes.	145
4.3.3. Determinación de la integridad de liposomas	146
4.3.4. Estudio de la eficiencia de encapsulación	148
4.4. CONCLUSIONES PARCIALES	151
4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153
CAPÍTULO V: ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	157
5.1. INTRODUCCIÓN.....	159
5.1.1. Sistemas portadores de fármacos	159
5.1.2. Metodología para la determinación de la liberación de fármacos a partir de dispersiones acuosas	159
5.1.3. Sistemas portadores de fármacos a partir de sistemas binarios y ternarios	160
5.1.3.1. Transporte de fármacos a partir de complejos de inclusión con ciclodextrinas	160
5.1.3.2. Transporte de fármacos a partir de la formación de sales	161
5.1.3.3. Transporte de fármacos a partir de la formación de complejos ternarios con ciclodextrinas	162
5.1.4. Transporte de fármacos a partir de sistemas nanoestructurados	162
5.1.4.1. Transporte de fármacos a partir de microemulsiones	162
5.1.4.2. Transporte de fármacos a partir de liposomas	163
5.1.5. Transporte de fármacos incorporados en sistemas binarios a partir de sistemas portadores nanoestructurados	163

5.1.5.1. Transporte de fármacos a partir de microemulsiones conteniendo β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG.	163
5.1.5.2. Transporte de fármacos a partir de liposomas conteniendo β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG.	164
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	167
5.2.1. MATERIALES	167
5.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	167
5.2.2.1. Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	167
5.2.2.2. Análisis estadístico	168
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	169
5.3. Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	169
5.3.1. Liberación de SMR e INM A partir de complejos binarios con CD y MEG	169
5.3.2. Liberación de SMR partir de complejos ternarios con CD y MEG	170
5.3.3. Liberación <i>in vitro</i> de SMR e INM a partir de microemulsiones	172
5.3.4. Liberación <i>in vitro</i> de SMR e INM a partir de microemulsiones en presencia de ligandos	172
5.3.5. Liberación <i>in vitro</i> de SMR e INM a partir de liposomas	173
5.3.6. Liberación <i>in vitro</i> de SMR e INM a partir de liposomas en presencia de ligandos	174
5.4. CONCLUSIONES PARCIALES	177
5.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
CAPÍTULO VI: ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD A TRAVÉS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES	185
6.1. INTRODUCCIÓN.....	187
6.1.1. Permeabilidad intestinal de fármacos	187
6.1.2. Difusión de fármacos a través de membranas biológicas	187
6.1.3. Métodos para la evaluación de la permeabilidad de fármacos	190
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	191
6.2.1. MATERIALES	191
6.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	191
6.2.2.1. Estudios de permeabilidad <i>in vitro</i>	191
6.2.2.1.1. Estudios de validación de la membrana	193
6.2.2.1.2. Clasificación de SMR e INM de acuerdo al SCB	194
6.2.2.1.3. Efecto de las diferentes formulaciones sobre la permeabilidad aparente de los fármacos	195
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	197
6.3.1. Estudios de permeabilidad a través de membranas artificiales	197

6.3.1.1. Desarrollo y evaluación del poder predictivo del modelo de permeabilidad	197
6.3.1.2. Clasificación de los fármacos modelo de acuerdo al SCB	198
6.3.1.3. Efecto de diferentes formulaciones sobre la permeabilidad aparente de los fármacos	199
6.4. CONCLUSIONES PARCIALES	207
6.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	209
CAPÍTULO VII:CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	209
ANEXOS.....	215

ABREVIATURAS

- 1D: en una dimensión
- 2D: en dos dimensiones
- A: área de superficie de la membrana
- A: especie ácida en estado neutro
- A: especie ácida en estado ionizado
- AS: aceite de Soja
- ASF: Análisis de Solubilidad de Fases
- B: especie básica en estado neutro
- BH⁺: especie básica en su estado ionizado
- C : concentración del fármaco en el lumen intestinal
- C_{FA} : concentración de fármaco en la fase acuosa
- C_{FO} : concentración de fármaco en la fase oleosa
- C₀ : concentración inicial de fármaco en el compartimento donador
- CD: ciclodextrina
- [CD]_t : concentración total de ciclodextrina
- COL: colesterol
- d(H): diámetro hidrodinámico
- D: coeficiente de difusión translacional
- DLS: dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering)
- DPF: diagramas Pseudo-ternario de fases
- dQ/dt: cantidad acumulativa de fármaco permeado en función del tiempo (mg/min)
- DRV: vesículas secas reconstituídas (Dried Reconstituted Vesicles)
- DRX: Difracción de Rayos X
- DSC: Calorimetrías Diferencial de Barrido
- δ_B : corrimientos químicos del fármaco en el complejo binario con CD
- δ_F : corrimientos químicos del fármaco puro
- δ_M : corrimientos químicos del fármaco en el complejo binario con MEG
- δ_S : corrimientos químicos de sulfamerazina libre
- $\delta_{S:M}$: corrimientos químicos de sulfamerazina en el complejo binario con MEG
- δ_C : corrimientos químicos de los protones de los fármacos en los complejos con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD o MEG
- $\delta_{F(M)}$: corrimientos químicos de los protones de los fármacos en ME libres de ligandos
- $\delta_{F(ML)}$: corrimientos químicos de los protones de los fármacos en los sistemas ME+ligando+fármaco
- δ_M : corrimientos químicos de los protones de ME en las ME libres de ligando

$\delta_{M(L)}$: corrimientos químicos de los protones de ME en los sistemas ME+ligando
 $\delta_{M(LF)}$: corrimientos químicos de los protones de ME en los sistemas ME+ligando+fármaco
dT : Corrimientos químicos de sulfamerazina en el complejo ternario
 $\Delta\delta$: desplazamientos en los corrimientos químicos observados en los espectros de RMN-¹H
 ΔH_{MEG} : entalpía de fusión de MEG puro
 $\Delta H_{muestra}$: entalpía de fusión de MEG calculada en la muestra
EM : emulsiones
EU: polioxietilenglicerol trihidroxiestearato (PEG)-40 (Eumulgin® HRE 40)
%Fa: fracción de dosis absorbida en humanos
F/CD: complejos fármaco/ciclodextrina
F/L: relación molar del fármaco sobre la concentración total de lípidos
F: fármaco
 F_{abs} : extensión de la absorción en humanos
 F_{AT} : valores de fluorescencia de calceína medidos antes de la adición de Triton X-100
FC: fosfatidilcolina
FCL: fármaco-en-ciclodextrinas-en-liposomas
FCS: fosfatidilcolina de soja
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (Food and Drug Administration).
 F_{DT} : valores de fluorescencia de calceína medidos después de la adición de Triton X-100
[F]_t: concentración total del fármaco
 Φ_c : fracción de volumen de agua crítica
G: Geles
H: viscosidad
HCD: metodología de hidratación de capa delgada
HLB: balance hidrofílico-lipofílico
HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.
HP- β -CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina
HSQC: Heteronuclear single quantum coherence
IFA: ingrediente farmacéutico activo.
INM: indometacina
IPD: índice de polidispersidad
IR: Espectrometría Infrarroja
K: constante del Boltzmann
 $K_{1:1}$: constante de formación de los complejos F/CD de estequiometría 1:1.

K_a : constante de disociación ácida
 K_C : constantes de formación de los complejos
 K_{CB} : constantes de estabilidad de los sistemas binarios
 K_{CT} : constantes de estabilidad de los sistemas ternarios
Latencia t_0 : porcentaje de latencia inicial
Latencia t : porcentaje de latencia a cada tiempo
LUV: vesículas grandes unilamelares (large unilamellar vesicles)
ME: microemulsiones
MEG: *N*-metilglucamina o meglumina
 MEG_{GCR} : grado de cristalinidad relativo de MEG
MFB: mezclas físicas de los componentes liofilizados
MFT: mezclas físicas de los componentes ternarios liofilizados
MLP: Microscopía de Luz polarizada
MLV: vesículas grandes multilamelares (multilamellar large vesicles)
M- β -CD: metil- β -ciclodextrina
O/W: ME aceite en agua o ME en equilibrio con la fase oleosa
O: fase oleosa
P: coeficiente de partición
PAMPA: permeabilidad de membranas artificiales paralelas [Parallel Artificial Membrane Permeability Assay]
 P_{app} : coeficientes de permeabilidad aparente
 P_{eff} : permeabilidad efectiva del fármaco a través de la membrana
PM: peso molecular
% Retención: porcentaje de retención de calceína en los liposomas
RMN- 1H : Resonancia Magnética Nuclear de Protones
ROESY: rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy
S: surfactantes
 S_0 : solubilidad intrínseca del fármaco
SBL: sistemas sólidos binarios obtenidos por liofilización
SCB: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
SF: Sistemas con separación de fases
 $S_{m\acute{a}x}$: solubilidades máximas aparentes
SMEDDS: sistemas auto microemulsionables (Self-microemulsifying drug delivery systems)
SMR: sulfamerazina
SRF: solución reguladora de pH de fosfatos
 β -CD: β -ciclodextrina

S_t : solubilidad total del fármaco

STL: sistemas sólidos ternarios obtenidos por el método de liofilización

SUV: vesículas pequeñas unilamelares (small unilamellar vesicles)

S_w : solubilidades de los fármacos en las fases acuosas

σ : Conductividad

T: temperatura absoluta

t: tiempo

TEA: trietanolamina

TGA: Análisis termogravimétrico

t_{res} : tiempo de residencia del fármaco en el lumen intestinal

UV: ultravioleta

V : volumen del compartimento receptor

W/O: ME agua en aceite o ME en equilibrio con la fase acuosa

W: fase acuosa

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. INTRODUCCIÓN

La disolución del fármaco, en los fluidos del tracto gastrointestinal, es una etapa esencial en la absorción de los compuestos que se administran por vía oral y por lo tanto, una adecuada velocidad de disolución en agua es un requisito fundamental para la absorción oral y el éxito clínico de los mismos cuando son administrados en formas farmacéuticas sólidas. Se estima que alrededor del 40 % de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) presentan baja solubilidad, lo cual puede influir sobre su eficacia terapéutica.

1.1.1. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICO (SCB)

La solubilidad, la velocidad de disolución y la permeabilidad intestinal son los principales factores biofarmacéuticos que afectan la magnitud de la absorción de un fármaco. Debido a ello, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos ["Food and Drug Administration" (FDA)] desarrolló un documento guía que refleja el impacto de estos procesos en el desempeño de un producto farmacéutico.¹ El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), desarrollado por Amidon,² es un lineamiento científico para la clasificación de fármacos, que se basa en la solubilidad acuosa y en la permeabilidad intestinal de los mismos. De acuerdo al SCB, los productos farmacéuticos pueden clasificarse de la siguiente manera:

CLASE	SOLUBILIDAD	PERMEABILIDAD
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

La clasificación, en términos de solubilidad, establece que una sustancia farmacéutica es considerada de alta solubilidad cuando la mayor dosis de un producto, de liberación inmediata, es soluble en un volumen del medio acuoso de 250 mL o menor y en un rango de pH comprendido entre 1 y 7,5. El volumen estimado de 250 mL deriva de los protocolos de estudios de bioequivalencia típicos, que prescriben la administración del producto farmacéutico a voluntarios sanos con un vaso (de aproximadamente 250 mL) de agua. Por este motivo, la clasificación, en términos de solubilidad, debe llevarse a cabo mediante el cálculo del volumen de un medio acuoso suficiente para disolver la mayor dosis del IFA en el rango de pH entre 1 y 7,5.

Por su parte, la clasificación, en términos de permeabilidad, se basa indirectamente en la extensión de la absorción (fracción de dosis absorbida) de una sustancia farmacéutica en humanos, así como directamente mediante determinaciones de la magnitud de masa transferida a través de la membrana intestinal humana. Un IFA es considerado altamente permeable cuando la extensión de la absorción en humanos es igual o superior al 90% de la dosis administrada. Para demostrar la eficacia de un método determinante de permeabilidad, para la aplicación del SCB, debe establecerse una correlación entre los

valores de permeabilidad obtenidos y los datos relacionados con la extensión de la absorción del fármaco en humanos, utilizando un número suficiente de IFA modelos, los cuales deben representar un rango de baja (<50%), moderada (por ej. 50-89%) y alta ($\geq 90\%$) permeabilidad.²

1.1.2. INGREDIENTES FARMACÉUTICOS ACTIVOS (IFA)

De acuerdo a lo establecido por la Farmacopea Argentina 7^{ma} Edición, un **ingrediente farmacéutico activo (IFA)** es cualquier sustancia o mezcla de sustancias, destinadas a ser usadas en la fabricación de un producto medicinal y que, cuando es utilizada en la producción de una droga, se transforma en ingrediente activo del producto elaborado. Tales sustancias están destinadas a proveer actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, cura, alivio, tratamiento, o prevención de enfermedades o para influenciar sobre la estructura del cuerpo.³

Sulfamerazina (SMR) o 4-amino-*N*-(4-metil-2-pirimidinil)bencenosulfonamida (Figura 1.1) es un IFA perteneciente a la familia de las sulfonamidas, la cual comprende a un grupo de bacteriostáticos sintéticos que poseen un amplio espectro contra la mayoría de las bacterias Gram-positivas y negativas. Actualmente, se las utiliza principalmente para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, aunque también se emplean para combatir infecciones sistémicas y en preparaciones oftálmicas.⁴ La dosis terapéutica utilizada para su administración por vía oral en adultos es de 167 mg.⁵ SMR es tanto una base como un ácido débil y este último grupo, al estar ionizado, presenta carga negativa (Figura 1.2). De acuerdo a lo establecido por la Farmacopea Europea, SMR es un fármaco escasamente soluble en agua y, si bien no se encuentra clasificada aún de acuerdo al SCB, sulfadiazina, su análogo estructural, fue clasificada como perteneciente a la Clase IV, la cual establece que el fármaco posee baja permeabilidad y baja solubilidad.⁶ Además, la excreción renal lenta de SMR, puede contribuir a la formación de cristaluria. Sumado a lo anterior, la absorción de SMR en el tracto gastrointestinal no conduce a valores suficientemente altos que eviten la necesidad de la administración del fármaco por vía parenteral.⁷

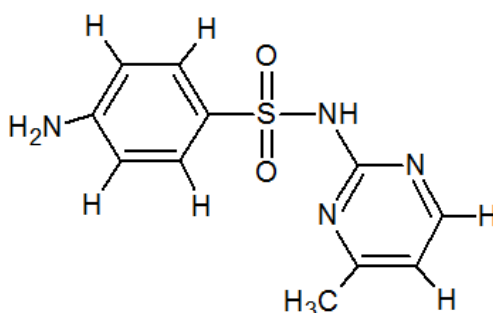


Figura 1.1. Estructura química de sulfamerazina.

La **Indometacina (INM)**, o ácido 1-(4-clorobenzoil)5-metoxi-2-metilindolacético (Figura 1.3), es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), analgésico y antipirético. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la ciclo-oxigenasa ⁸ y es ampliamente utilizado para el tratamiento del dolor causado por la artritis reumatoidea y otras enfermedades degenerativas de las articulaciones.⁹ Es usualmente administrado por vía

oral, utilizando dosis terapéuticas en adultos de 25 o 50 mg,¹⁰ aunque puede también ser suministrado por vía intravenosa, supositorios o geles. A través de su descomposición forma dos productos de degradación: ácido 4-cloro-benzoico y ácido 5-metoxi-2-metilindolacético.⁸ INM es un ácido débil que al estar ionizado presenta carga negativa (Figura 1.4). Debido a que posee baja solubilidad acuosa y alta permeabilidad, pertenece a la Clase II del SCB.^{9,11} Además, la escasa solubilidad de este fármaco puede incrementar la incidencia de efectos adversos, como la irritación del tracto gastrointestinal, debido a la prolongación del tiempo de contacto con la mucosa del mismo.¹¹

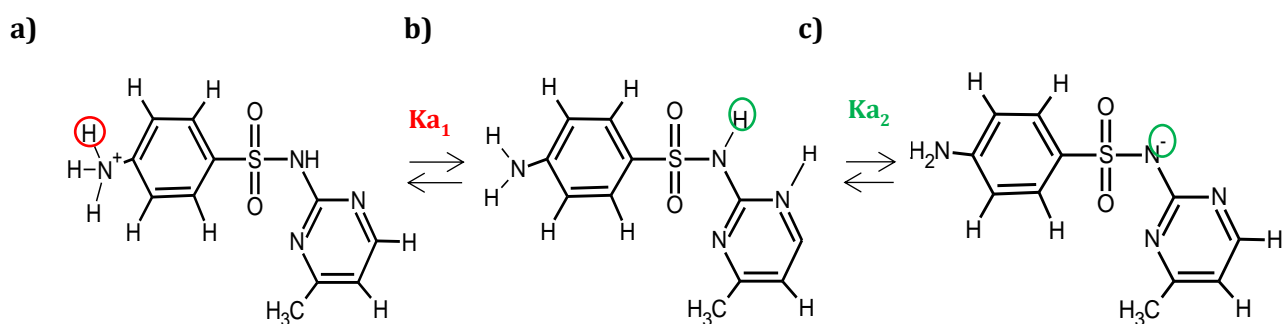


Figura 1.2. Equilibrios de ionización de sulfamerazina ($pK_{a1} = 2,60$; $pK_{a2} = 6,90$), siendo: a) BH^+ (especie básica en su estado ionizado); b) A o B (especie ácida o básica en estado neutro, según corresponda) y c) A^- (especie ácida en estado ionizado).

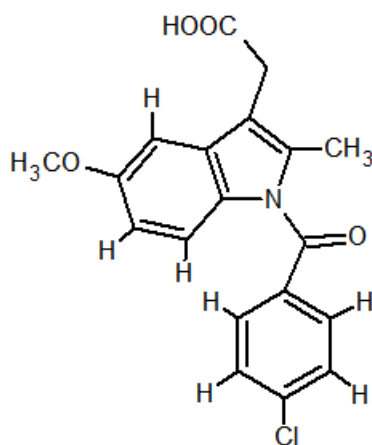


Figura 1.3. Estructura química de Indometacina.

Considerando las dificultades asociadas al tratamiento con estos fármacos, el uso de estrategias apropiadas, que permitan incrementar la solubilidad acuosa o la absorción gastrointestinal, podría reducir los efectos adversos indeseados mediante la administración de dosis menores. También, los datos obtenidos de estudios experimentales aplicados a estos IFA podrían resultar útiles para otros fármacos de grado de hidrofiliicidad-lipofiliicidad similar. Diversas estrategias de formulación han sido aplicadas a SMR, de manera de mejorar su biodisponibilidad, como el uso de mezclas de co-solventes,¹² nanocristales,¹³ dispersiones sólidas amorfas conteniendo polímeros,¹⁴ películas de pectina,¹⁵ membranas de quitosano^{16,17} y transformación de fase.^{18,19} Para INM, ha sido reportada la formación de

complejos con hidrolisato de caseína,²⁰ dispersiones sólidas en hidrogeles,²¹ co-cristales con sacarina,²² cápsulas con agentes solubilizantes,²³ hidrogeles poliméricos,⁹ dispersiones sólidas ²⁴ y el uso de fluidos supercríticos,²⁵ entre otros.

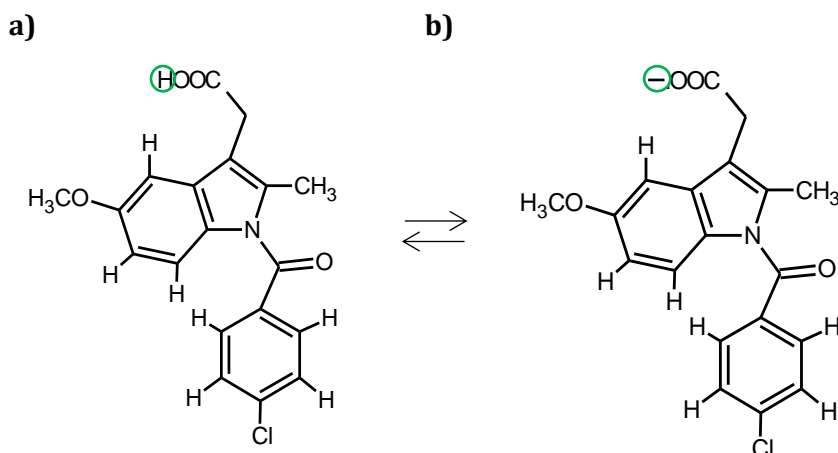


Figura 1.4. Equilibrio de ionización de Indometacina ($pK_{a1} = 4,50$), siendo: a) AH (especie ácida en estado neutro) y b) A⁻ (especie ácida en estado ionizado).

1.1.3. SISTEMAS PORTADORES DE FÁRMACOS A PARTIR DE COMPLEJOS MOLECULARES

En la literatura se encuentra una gran cantidad de trabajos donde se trata de revertir la baja biodisponibilidad de fármacos insolubles mediante la utilización de diferentes métodos. Dentro de estos, se destaca la encapsulación molecular de los IFA con ciclodextrinas (CD). Las **CD** son oligosacáridos cíclicos que poseen una superficie exterior hidrofílica y una cavidad central lipofílica. Se conoce que las ciclodextrinas son capaces de formar complejos de inclusión con una gran variedad de moléculas, tanto en estado sólido como en solución acuosa. La encapsulación de la molécula afecta sus propiedades fisicoquímicas, dando como resultado, en la mayoría de los casos estudiados, un incremento de la solubilidad y de la permeabilidad a través de membranas y, en algunos casos, también de la estabilidad, tanto química como física.^{9,26-29} Sin embargo, por diversas razones, tales como su alto peso molecular, su solubilidad en agua y su posible toxicidad parenteral, la cantidad de este producto que puede utilizarse en las formulaciones farmacéuticas, es limitado. Se observó que la aplicación simultánea de formación de sales y complejación con ciclodextrinas mejora el desempeño farmacéutico de fármacos con carácter ácido o básico débil.³⁰⁻³⁵ Debido a ello, podría decirse que la selección de un contraión adecuado, así como de la ciclodextrina correcta, es una estrategia poderosa para reformular fármacos genéricos de manera tal que le aseguren un desempeño comparable con aquellos productos de última generación. La *N*-metilglucamina o **meglumina (MEG)** es una amina polihidroxílica que es utilizada como excipiente en medicamentos. Esta molécula orgánica exhibe propiedades básicas y por lo tanto, es capaz de interactuar con compuestos ácidos débiles, por lo cual se la ha utilizado para la obtención de sales de fármacos poco solubles en agua, con el objetivo de revertir este efecto negativo.³⁵ Debido a ello, es de sumo interés poder evaluar a

la meglumina como un nuevo componente ternario para favorecer la complejación de IFA con carácter de ácido débil con ciclodextrinas.

1.1.4. SISTEMAS PORTADORES DE FÁRMACOS NANOESTRUCTURADOS

La **nanotecnología** es el área del conocimiento que trata acerca del saber y el control de la materia en dimensiones cercanas al intervalo de 1 nm a 1 µm. En la nanotecnología, la **nanofarmacia** se podría definir como el uso de la nanotecnología para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades y heridas, así como para mejorar la salud y el funcionamiento del organismo humano y de otros seres vivientes. Algunas de sus aplicaciones incluirían el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos, el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos con localización o direccionamiento específico.

El futuro de la farmacia, en el área de la nanotecnología, con respecto al desarrollo de productos terapéuticos y sistemas de suministro de fármacos, estaría ligado o sería relativo a:

- El diseño de materiales estructurados, multifuncionales, capaces de atacar enfermedades específicas.
- El diseño de materiales conteniendo funciones que permitan el transporte a través de las barreras biológicas.
- El diseño de plataformas nanoestructuradas para la ingeniería de tejidos.
- El diseño de dispositivos sensibles a estímulos para la liberación de fármacos.
- El diseño de tratamientos orientados físicamente para la administración local de productos terapéuticos.³⁶

Dentro de las técnicas de solubilización, que han sido estudiadas en los últimos años, se incluye el uso de sistemas nanoestructurados, como las microemulsiones y los liposomas. Las **microemulsiones (ME)** son sistemas isotrópicos nanoestructurados, termodinámicamente estables, constituidas usualmente por una fase oleosa, una fase acuosa, un surfactante y un cosurfactante. Cuando las concentraciones de estos componentes son favorables, estos se emulsionan espontáneamente para formar una microemulsión monodispersa y transparente. Las ME son conocidas por sus propiedades para aumentar la solubilidad, la biodisponibilidad y la estabilidad de fármacos.³⁷⁻³⁹ Los **liposomas** son vesículas coloidales cuyos tamaños se encuentran en el rango de unos pocos nanómetros a varios micrómetros de diámetro, con una o varias bicapas lipídicas rodeando compartimentos acuosos.⁴⁰ Los liposomas han recibido atención por su utilidad como sistemas portadores de IFA ya que en ellos pueden ser incorporados fármacos hidrofílicos en la fase acuosa interna, mientras que fármacos hidrofóbicos pueden insertarse dentro de la bicapa lipídica hidrofóbica, mejorando así las propiedades desfavorables de los IFA y permitiendo su transporte hacia el sitio de acción.⁴¹⁻⁴³

A su vez, la combinación de estos sistemas nanoestructurados con CD o MEG podría proveer sistemas con poder de solubilización sinérgico, lo que representa un avance con relación a la limitación de los sistemas individuales, en cuanto al poder de solubilización de fármacos poco hidrosolubles.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este proyecto contempla el desarrollo de estrategias que permitan aumentar la solubilidad de fármacos utilizando herramientas nanotecnológicas, ya que esta propiedad es un problema farmacotécnico/biofarmacéutico crítico.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos se propusieron:

- Estudiar el complejamiento con ciclodextrinas y/o meglumina sobre la solubilidad de SMR e INM.
- Extender el estudio sobre los mismos sistemas, en estado sólido.
- Preparar de formulaciones basadas en microemulsiones.
- Preparar de liposomas para la vehiculización de los fármacos.
- Estudiar de la asociación de los complejos moleculares con microemulsiones y liposomas.
- Estudiar el efecto de las formulaciones sobre el transporte y la liberación *in vitro* de los fármacos.
- Realizar estudios de permeabilidad a través de membranas artificiales para los fármacos seleccionados y sus complejos formados, en presencia y ausencia de microemulsiones o liposomas.

1.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (CDER/FDA). Guidance for Industry Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and and bioequivalence studies for immediate release dosage forms based on a biopharmaceutical classification system. Center for Drug Evaluation and Research. 2000;
2. Lipka E, Amidon GL. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J Control Release* 1999;62:41-9.
3. Ministerio de Salud de la Nación, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). *Farmacopea Nacional Argentina*. 7^{ma} ed. Buenos Aires: 2014.
4. Forbes GB, Perley A, Dehlinger J. The use of sulfamerazine in infants and children. *J Pediatr* 1946;28:24-36.
5. MIMS Drug Information System. Sulfamerazine [Internet]. 2014 [Last access: 2014 Sep 2]; Available from: <http://www.mims.com/USA/drug/info/sulfamerazine/?type=full&mtype=generic>
6. Araújo MV, Barbosa EK, Lázaro G, Conejero L, Almeida LE, Barreto L, et al. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorg Med Chem* 2008;16:5788-94.
7. Fuchs SM, Elsner P. Sulfonamides in dermatology. *Dis Mon* 2004;:7-11.
8. Nováková L, Matysová L, Havlíková L, Solich P. Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel. *J Pharm Biomed Anal* 2005;37:899-905.
9. Xin J, Guo Z, Chen X, Jiang W, Li J, Li M. Study of branched cationic β -cyclodextrin polymer/indomethacin complex and its release profile from alginate hydrogel. *Int J Pharm* 2010;386:221-8.
10. MIMS Drug Information System. Indomethacin [Internet]. 2014 [Last access: 2014 Sep 2]; Available from: <http://www.mims.com/USA/drug/info/Indomethacin/Indomethacin Capsule?type=full#Dosage>
11. Nokhodchi A. The effect of type and concentration of vehicles on the dissolution rate of a poorly soluble drug (indomethacin) from lquisolid compacts. *J Pharm Pharm Sci* 8:18-25.
12. Delgado DR, Martínez F. Preferential solvation of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in ethanol + water solvent mixtures according to the IKBI method. *J Mol Liq* 2014;193:152-9.
13. Lou H, Liu M, Qu W, Johnson J, Brunson E, Almoazen H. The influence of sodium salts (iodide, chloride and sulfate) on the formation efficiency of sulfamerazine nanocrystals. *Pharm Dev Technol* 2014;19:548-55.
14. Caron V, Hu Y, Tajber L, Erxleben A, Corrigan OI, McArdle P, et al. Amorphous solid dispersions of sulfonamide/soluplus® and sulfonamide/PVP prepared by ball milling. *AAPS PharmSciTech* 2013;14:464-74.
15. Anuar NK, Wong TW, Taib MN. Microwave modified non-crosslinked pectin films with modulated drug release. *Pharm Dev Technol* 2012;17:110-7.

16. De Lima MSP, Freire MS, Fonseca JLC, Pereira MR. Chitosan membranes modified by contact with poly (acrylic acid). *Carbohydr Res* 344:1709–15.
17. Li X, Nan K, Chen H, Xu Y. Preparation and characterization of chitosan nanopores membranes for the transport of drugs. *Int J Pharm* 2011;420:371–7.
18. Kawakami K, Asami Y, Takenoshita I. Calorimetric investigation of solvent-mediated transformation of sulfamerazine polymorphism. *J Pharm Sci* 2010;99:76–81.
19. Lee S, Choi A, Kim W-S, Myerson AS. Phase transformation of sulfamerazine using a Taylor vortex. *Cryst Growth Des* 2011;11:5019–29.
20. Inada A, Oshima T, Takahashi H, Baba Y. Enhancement of water solubility of indomethacin by complexation with protein hydrolysate. *Int J Pharm* 2013;453:587–93.
21. Sun DD, Ju TR, Lee PI. Enhanced kinetic solubility profiles of indomethacin amorphous solid dispersions in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;81:149–58.
22. Chun N-H, Wang I-C, Lee M-J, Jung Y-T, Lee S, Kim W-S, et al. Characteristics of indomethacin–saccharin (IMC–SAC) co-crystals prepared by an anti-solvent crystallization process. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;85:854–61.
23. Maheshwari RK, Rathore A, Agrawal A, Gupta MA. New spectrophotometric estimation of indomethacin capsules with niacinamide as hydrotropic solubilizing agent. *Pharm Methods* 2011;2:184–8.
24. Shibata Y, Fujii M, Sugamura Y, Yoshikawa R, Fujimoto S, Nakanishi S, et al. The preparation of a solid dispersion powder of indomethacin with crospovidone using a twin-screw extruder or kneader. *Int J Pharm* 2009;365:53–60.
25. Tozuka Y, Miyazaki Y, Takeuchi H. A combinational supercritical CO₂ system for nanoparticle preparation of indomethacin. *Int J Pharm* 2010;386:243–8.
26. Linares M, de Bertorello MM, Longhi M. Solubilization of naphthoquinones by complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm* 1997;159:13–8.
27. Granero G, Garnero C, Longhi M. The effect of pH and triethanolamine on sulfisoxazole complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. 2003;20:285–93.
28. Zoppi A, Quevedo MA, Longhi MR. Specific binding capacity of β -cyclodextrin with cis and trans enalapril: Physicochemical characterization and structural studies by molecular modeling. *Bioorg Med Chem* 2008;16:8403–12.
29. Zoppi A, Garnero C, Linck YG, Chattah AK, Monti GA, Longhi MR. Enalapril: β -CD complex: Stability enhancement in solid state. *Carbohydr Polym* 2011;86:716–21.
30. Mura P, Maestrelli F, Cirri M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and aminoacids. *Int J Pharm* 2003;260:293–302.
31. P. Chiesi, P. Ventura, M.D. Canale et al. High solubility multicomponent inclusion complexes consisting of an acidic drug, a cyclodextrin and a base, Google Patents, 1998;
32. Redenti E, Szente L, Szejtli J. Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications. *J Pharm Sci* 2000;89:1–8.
33. Redenti E, Szente L, Szejtli J. Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications. *J Pharm Sci* 2001;90:979–86.

34. Granero GE, Maitre MM, Garnero C, Longhi MR. Synthesis, characterization and *in vitro* release studies of a new acetazolamide-HP- β -CD-TEA inclusion complex. Eur J Med Chem [Internet] 2008;43:464-70. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523407001912>
35. Gupta P, Bansal AK. Ternary amorphous composites of celecoxib, poly(vinyl pyrrolidone) and meglumine with enhanced solubility. Pharmazie 2005;60:830-6.
36. Villafuerte-Robles L. Nanotecnología Farmacéutica. Razón y Palabra 2009;68:1-20.
37. Taylor P, Fanun M. Solubilization of Azithromycin in Microemulsions Based on Mixed Nonionic Surfactants and Mixed Oils Solubilization of Azithromycin in Microemulsions Based on Mixed Nonionic Surfactants and Mixed Oils. J Disper Sci Technol 2012;33:185-90.
38. Djekic L, Primorac M, Filipic S, Agbaba D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. Int J Pharm 2012;433:25-33.
39. Nornoo AO, Chow DS-L. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel: II. Stability, *in vitro* release and pharmacokinetics. Int J Pharm 2008;349:117-23.
40. Markoutsas E, Pampalakis G, Niarakis A, Romero I a., Weksler B, Couraud PO, et al. Uptake and permeability studies of BBB-targeting immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. Eur J Pharm Biopharm 2011;77:265-74.
41. Paixão P, Gouveia LF, Morais JAG. Prediction of the human oral bioavailability by using *in vitro* and *in silico* drug related parameters in a physiologically based absorption model. Int J Pharm 2009;429:84-98.
42. Mourão SC, Costa PI, Salgado HRN, Gremião MPD. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. Int J Pharm 2005;295:157-62.
43. Chen Y, Lu Y, Chen J, Lai J, Sun J, Hu F, et al. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. Int J Pharm 2009;376:153-60.

CAPÍTULO II:

COMPLEJOS BINARIOS Y TERNARIOS

2.1. INTRODUCCIÓN

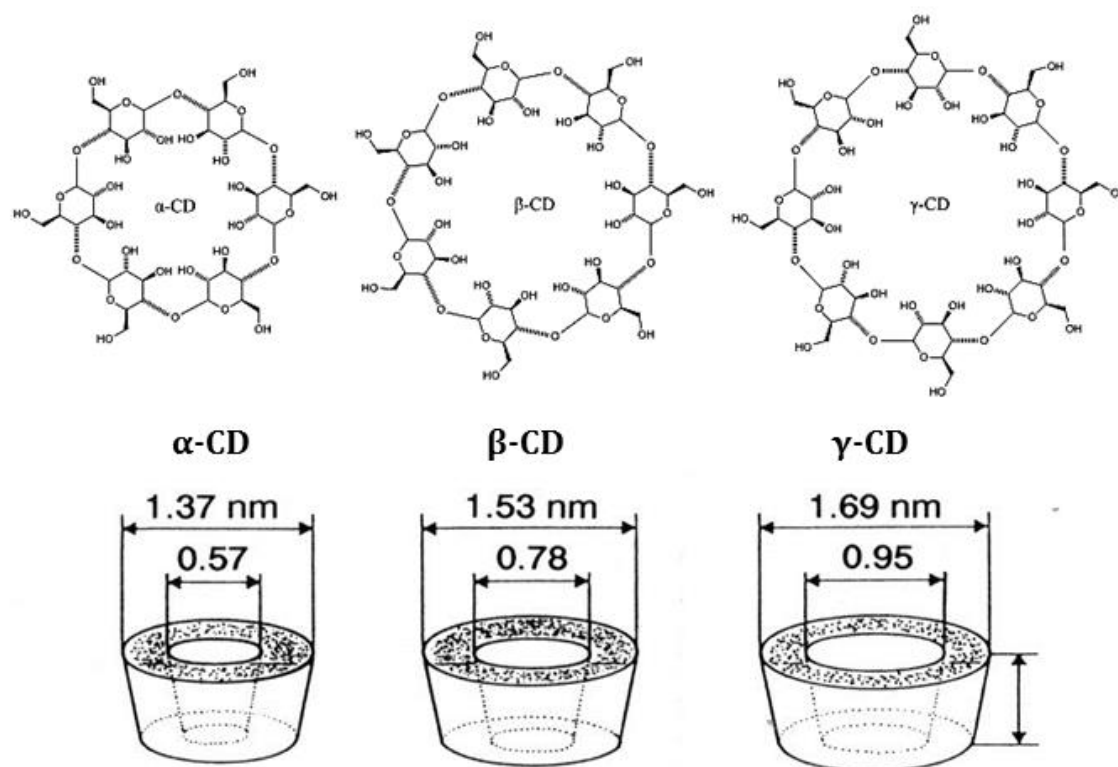
El objetivo del presente capítulo fue la evaluación de la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (CD) y de sistemas binarios con Meglumina (MEG), tanto en solución como en estado sólido, así como su efecto sobre la solubilidad acuosa de los fármacos modelo, Sulfamerazina (SMR) e Indometacina (INM). Los estudios de caracterización, que se llevaron a cabo en solución, fueron Análisis de Solubilidad de Fases (ASF) y Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN- ^1H). La evaluación de la formación de los sistemas en estado sólido, fue realizada por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TGA), Espectrometría Infrarroja (IR) y Difracción de Rayos X (DRX). A partir de los resultados obtenidos para complejos binarios, nos propusimos estudiar la formación de complejos ternarios de fármacos con CD, debido a la habilidad de la macromolécula para incrementar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua, utilizando Meglumina como componente ternario, a fin de potenciar la solubilización por CD. Los sistemas obtenidos fueron también caracterizados en solución y en estado sólido mediante las técnicas mencionadas previamente.

2.1.1. ENCAPSULACIÓN MONOMOLECULAR

La encapsulación monomolecular, a partir de la formación de complejos de inclusión, ha resultado promisoría para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas. En general, la formación de complejos de inclusión monomoleculares involucra la encapsulación espacial de una molécula huésped en la cavidad de una molécula portadora sin formar enlaces covalentes entre ellos.¹

2.1.1.1. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS

Las CD (Figura 2.1) son oligosacáridos cíclicos que consisten en seis, siete u ocho unidades de D-(+)-glucopiranososa (α , β o γ) unidos mediante enlaces glicosídicos α -D-(1 \rightarrow 4). La forma de la molécula se asemeja a la de un cono truncado, con los grupos hidroxilos secundarios ubicados hacia la abertura mayor de la cavidad y los grupos primarios hacia la más angosta. Los átomos de hidrógeno se encuentran orientados hacia la parte interna de la cavidad, dando como resultado un interior hidrofóbico con una superficie externa de carácter hidrofílico. Por este motivo, las CD son solubles en agua y, al mismo tiempo, pueden acomodar una gran variedad de especies hidrofóbicas dentro de su cavidad generando la formación de complejos de inclusión, siendo así los portadores más utilizados, debido a su habilidad para unirse a moléculas orgánicas en solución acuosa y en estado sólido mediante interacciones no covalentes,^{2,3} por lo que, de manera exitosa mejoran las propiedades farmacéuticas de moléculas activas.⁴⁻⁶ Debido a que el diámetro interno de la cavidad y el tamaño de la molécula huésped son de primordial significancia para la formación de complejos de inclusión,² la β -CD es la más utilizada por la dimensión de su cavidad.⁷⁻¹⁰



	α -CD	β -CD	γ -CD
n	6	7	8
PM	972	1135	1297
S (H₂O), g/100 mL, 25 °C	14,5	1,85	23,2
Diámetro de la Cavity, Å	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volumen de la Cavity, Å³	174	262	427

Figura 2.1. Diferentes tipos de ciclodextrinas (CD).

Los complejos de inclusión normalmente exhiben mayor solubilidad acuosa^{5,11-13} y estabilidad química que los fármacos puros.¹⁵⁻¹⁹ Además, las CD pueden actuar como promotores de la permeación mediante la vehiculización de moléculas hidrofóbicas en solución y liberando las mismas sobre la superficie de una membrana biológica, conduciendo a incrementar la biodisponibilidad de los fármacos y la permeación transepitelial.^{2,5,12}

2.1.1.1.1. DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS

A pesar de los beneficios que presentan las CD, el alto peso molecular, costo elevado, capacidad de producción y la isotonicidad de las formulaciones parenterales han limitado su uso en formulaciones farmacéuticas, conduciendo a minimizar la concentración de las CD en caso de ser posible.^{14,15} Varios derivados de CD han sido desarrollados en las últimas décadas, los cuales expandieron extensamente las aplicaciones de estos oligosacáridos cíclicos y permitieron superar los serios inconvenientes de la CD nativa, como su baja solubilidad y toxicidad.¹⁶⁻²² Por ejemplo, la sustitución de los grupos hidroxilos podría romper los enlaces de hidrógeno e incrementar significativamente su solubilidad acuosa. La complejación de estos derivados de β-CD, como metil-β-ciclodextrina (M-β-CD) e hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) (Figura 2.2),⁸ con ingredientes farmacológicamente activos, produce propiedades diferentes a las de la molécula original y usualmente resulta en un aumento de la solubilidad acuosa,^{4,23,24} mejor estabilidad química^{25,26} y mayor permeabilidad y biodisponibilidad de los fármacos.^{27,28}

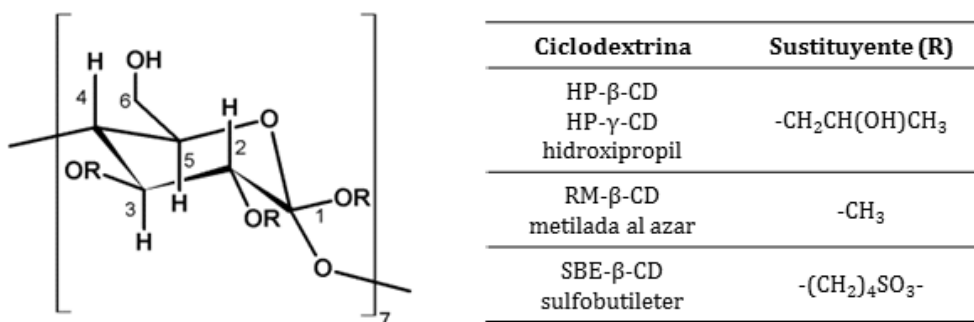


Figura 2.2. Derivados de Ciclodextrinas más utilizados.

2.1.1.1.2. FORMACIÓN DE COMPLEJOS FÁRMACO-CICLODEXTRINA

Los complejos fármaco/ciclodextrina (F/CD) de estequiometría 1:1 son los más comunes. En ellos, una molécula de fármaco (F) forma un complejo con una molécula de ciclodextrina (CD):



2.1.1.1.3. ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FASES (ASF)

El análisis de Solubilidad de Fases (ASF) constituye un método tradicional para la determinación del efecto de agentes acomplejantes sobre la solubilidad de un sustrato y es adecuado no sólo para la estimación de la constante de formación, sino también para la elucidación de la estequiometría del complejo en equilibrio. El mismo fue desarrollado por Higuchi y Connors.²⁹

Experimentalmente, un exceso de fármaco con escasa solubilidad acuosa (F) es incorporado dentro de varios tubos a los cuales se adiciona un volumen constante de un vehículo acuoso conteniendo concentraciones crecientes de CD. La necesidad de un exceso de sustrato se basa en mantener la actividad termodinámica del fármaco lo más alta posible. Los tubos deben ser agitados a temperatura constante hasta alcanzar el equilibrio. Posteriormente, las suspensiones son filtradas y la concentración total del fármaco en solución ($[F]_t$) es cuantificada mediante técnicas analíticas apropiadas (espectrofotometría UV, HPLC, etc.). A partir de ello, puede obtenerse la gráfica de $[F]_t$ en función de la concentración total de ciclodextrina ($[CD]_t$), que constituye el ASF. Tras el análisis del perfil de la isoterma, pueden identificarse diferentes comportamientos. En términos generales, existen dos tipos de gráficos de ASF: A y B (Figura 2.3).

En los **Diagramas de solubilidad de tipo A**, la solubilidad aparente del sustrato aumenta en función de la concentración de CD e indican la formación de complejos de mayor solubilidad que la del sustrato libre. A su vez, tres subtipos han sido definidos:

Isotermas de tipo A_L: se observa un incremento lineal de la solubilidad en función de la concentración del ligando e indican la formación de complejos de primer orden respecto a CD, pudiendo ser de primer orden o de orden superior respecto al fármaco (F:CD; F₂:CD; F₃:CD; etc.). Si la pendiente de la isoterma tipo A_L es mayor a la unidad, se asume la formación de complejos de alto orden. Generalmente, en ausencia de mayor información, cuando la pendiente de la isoterma es menor a la unidad se asume la formación de complejos 1:1.

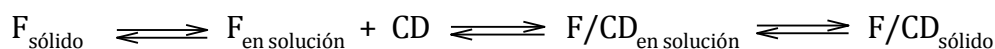
Isotermas de tipo A_P: presentan una desviación positiva de la linealidad, pudiendo sugerir que el agente solubilizante es proporcionalmente más efectivo a altas concentraciones, indicando la formación de complejos de alto orden respecto a la CD, a altas concentraciones de la misma (F:CD; F:CD₂; F:CD₃; etc).

Isotermas de tipo A_N: presentan una desviación negativa de la linealidad, pudiendo insinuar que el agente solubilizante es menos efectivo a altas concentraciones, lo que puede atribuirse a cambios en la naturaleza del solvente por parte del ligando a diferentes concentraciones y/o a la auto-agregación del agente solubilizante a altas concentraciones.

Los **Diagramas de solubilidad de tipo B** son indicativos de la formación de complejos con solubilidad acuosa limitada. Dos subtipos han sido definidos:

Isotermas tipo B_s: a medida que se incrementa la concentración de CD, ocurre la formación de un complejo soluble que aumenta la solubilidad total del sustrato. En un punto del proceso de solubilización (Punto a, Figura 2.3 b) se alcanza la solubilidad máxima del fármaco, la cual es la suma del fármaco libre y acomplejado. Si bien esta porción inicial puede considerarse como un diagrama de Tipo A, tras la incorporación de cantidades adicionales de CD ocurre la formación de un complejo que precipita mientras existe fármaco sólido remanente, de manera tal que la disolución y la complejación del mismo pueden ocurrir de manera simultánea para mantener el valor de F_t. En el rango de concentraciones

en el que se observa una meseta en la gráfica (línea a-b, Fig 2.3 b), se asume que ocurre el siguiente equilibrio:



En un punto b, (Figura 2.3.b), todo el fármaco sólido habrá sido consumido y la adición de CD resultará en la formación de un complejo insoluble adicional, el cual precipitará disminuyendo la concentración total de fármaco en solución, $[F_t]$.

Isotermas tipo B_i: son similares a los perfiles B_s, a diferencia de que los complejos formados son tan insolubles que no presentan la porción inicial ascendente del diagrama.³⁰ La solubilidad aparente de sustrato permanece sin cambios perceptibles, hasta que este se convierte completamente en un complejo insoluble.²⁹⁻³¹

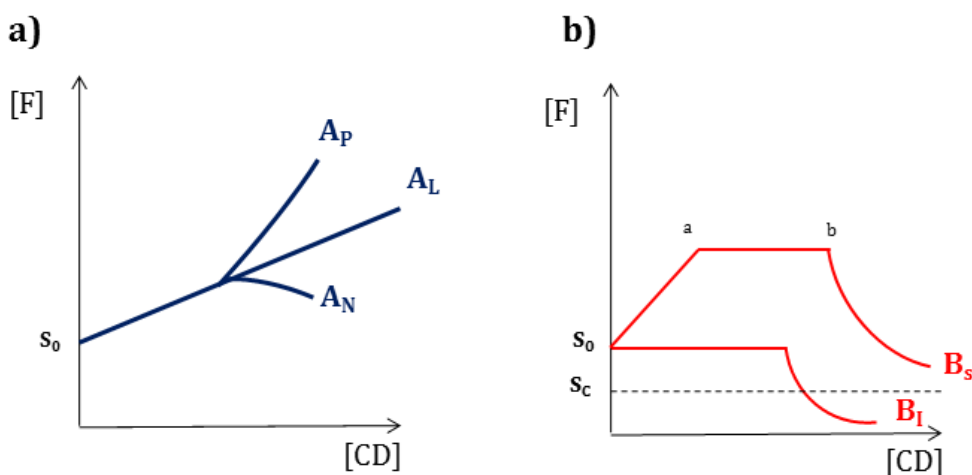


Figura 2.3. Diagramas de Solubilidad de Fases de tipo A y B (a) y b), respectivamente] de acuerdo a la clasificación de Higuchi y Connors.³⁴

2.1.1.1.4. ESTIMACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN

El valor de la constante de formación ($K_{1:1}$) es usado para comparar la afinidad de fármacos por diferentes CD o derivados de las mismas. La solubilidad total del fármaco (S_t) en la solución acuosa con CD será:

$$S_t = S_0 + \frac{K_{1:1}S_0}{1 + K_{1:1}S_0} [CD]_t \quad (2)$$

donde S_0 es la solubilidad intrínseca del fármaco y $[CD]_t$, la concentración total de CD en el medio acuoso.

De acuerdo a la ecuación (2), una gráfica de S_t en función de $[CD]_t$, para la formación de un complejo soluble, da una línea recta, como puede observarse en los diagramas tipo A_L y en las porciones iniciales de los diagramas tipo A_P , A_N y B_S , cuya pendiente $[K_{1:1}S_0/(1 + K_{1:1}S_0)]$ es menor a la unidad cuando la estequiometría es 1:1 y el intercepto es igual a S_0 . A partir de la pendiente y de S_0 puede calcularse $K_{1:1}$:^{29,31}

$$K_{1:1} = \frac{\text{pendiente}}{S_0(1 - \text{pendiente})} \quad (3)$$

2.1.1.2. FORMACIÓN DE SALES

La formación de sales es una técnica bien establecida y efectiva para incrementar la solubilidad y la velocidad de disolución y consecuentemente, la biodisponibilidad oral de principios activos ácidos y básicos,^{32,33} por lo que la selección de un contraión adecuado es de suma importancia.

2.1.1.2.1. MEGLUMINA (MEG)

La *N*-acetil glutamina, también conocida como meglumina (MEG) (Figura 2.4), es una amina polihidroxílica que es utilizada como excipiente en medicamentos. Esta molécula orgánica exhibe propiedades básicas (Figura 2.5) y por lo tanto, es capaz de interactuar con compuestos ácidos débiles, por lo cual se lo ha utilizado para la obtención de sales de fármacos poco solubles en agua, con el objetivo de revertir este efecto negativo.³⁴ MEG ha demostrado incrementar la solubilidad,^{34,35} la velocidad de liberación^{36,37} y la estabilización³⁷ de moléculas con propiedades ácidas débiles.

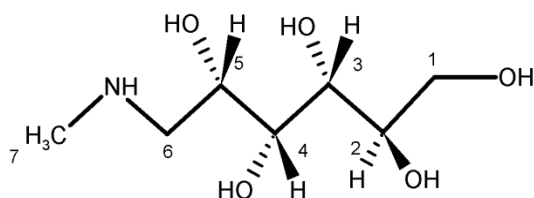


Figura 2.4. Estructura química de Meglumina (MEG).

2.1.2. COMPLEJOS MULTICOMPONENTE

La solubilidad total de un IFA, en presencia de CD, puede ser aumentada considerablemente mediante el ajuste del pH o mediante el uso de un componente ternario apropiado, incluyendo la incorporación de polímeros al medio de complejación,^{1,14} la ionización del fármaco y la formación de sales,^{25,30,38,39} o la adición de sales orgánicas.²¹

Se observó que la aplicación simultánea de formación de sales y complejación con ciclodextrinas mejora el desempeño farmacéutico de IFA con carácter ácido o básico débil.⁴⁰⁻⁴² Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha desarrollado un sistema ternario consistente en sulfisoxazol con hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), usando

trietanolamina (TEA) como agente de co-solubilización, el cual mejoró la solubilidad y las características de disolución de este fármaco.⁴² La formación de un complejo de inclusión multicomponente de acetazolamida con HP- β -CD y TEA, obtenido en nuestro grupo de trabajo, aumentó en forma significativa la solubilidad en agua y la velocidad de liberación, *in vitro* de este compuesto, utilizando una membrana sintética de nitrocelulosa.²⁴ Además, se determinó que el sistema ternario acetazolamida:HP- β -CD:TEA ha resultado una herramienta poderosa para la formulación de gotas oftálmicas, debido a que disminuye la presión intraocular, en estudios realizados en conejos.⁴³ Debido a ello, podría decirse que la selección de un contraión adecuado, así como de la ciclodextrina correcta, es una estrategia poderosa para reformular fármacos genéricos de manera tal que le aseguren un desempeño comparable con aquellos productos de última generación.

Para ello, es de sumo interés poder evaluar la eficacia de MEG como un nuevo componente ternario para favorecer la complejación con CD de IFA con carácter de ácidos débiles, debido a que demostró revertir la baja solubilidad de fármacos insolubles mediante la formación de sales con los mismos.^{34,35}

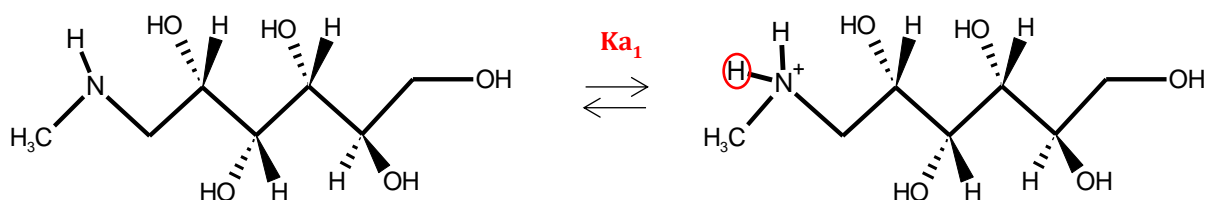


Figura 2.5. Equilibrio de ionización de MEG ($pK_{a1} = 9,50$).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. MATERIALES

Se utilizaron los siguientes productos de origen comercial: SMR (Parafarm®, Argentina) y MEG (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO); β -CD (PM= 1135), M- β -CD (PM=1190) e HP- β -CD (PM=1325) fueron cordialmente donadas por Ferromet® (Agente de Roquette® en Argentina). El resto de los materiales y solventes utilizados fueron de grado analítico.

En los estudios se utilizó agua doblemente destilada y desionizada generada por un sistema de purificación de agua Millipore Milli-Q.

2.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.2.2.1. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN

2.2.2.1.1. ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FASES (ASF)

El ASF fue realizado de acuerdo al método reportado por Higuchi y Connors.³⁴ Cada ensayo fue realizado por triplicado, en los cuales un exceso de sustrato, para mantener condiciones de saturación, fue suspendido en un volumen final de 5 mL de agua o solución reguladora de pH, conteniendo cantidades crecientes de los ligandos (β -CD= 0-15 mM; M- β -CD= 0-100 mM; HP- β -CD= 0-18 mM; MEG=0-250 mM), en relación a sus solubilidades acuosas. Para la evaluación de los sistemas ternarios fue adicionada una concentración fija de MEG (3 mM). Las suspensiones fueron mantenidas a una temperatura constante de $25,0 \pm 0,1$ °C durante 72 h utilizando un baño termostatzado [HAAKE DC10 thermostat (Haake®, Paramus, NJ)] para alcanzar el equilibrio y, fueron colocadas en un baño de ultrasonido (Ultrasonic LC 30 H Elma®), cada 12 h, durante 15 min, para favorecer la solubilización. Las soluciones reguladoras de pH fueron preparadas mezclando las cantidades correspondientes de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 y ajustando los valores por adición de ácido fosfórico o hidróxido de potasio. Las determinaciones fueron realizadas con un pH-metro Hanna® HI 255, provisto de un electrodo de vidrio combinado, utilizando soluciones patrones McIlvaine para su calibración. Una vez alcanzado el equilibrio, las muestras fueron filtradas a través de membranas de polivinilideno-fluoro de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Millipore, USA) y analizadas espectrofotométricamente (Shimadzu® UV-160) utilizando cubas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Luego, las constantes de formación de los complejos binarios (K_{CB}) fueron determinadas a partir de la pendiente obtenida por regresión lineal de los diagramas de solubilidad de fases tipo A_L , o bien de la porción inicial de los diagramas tipo A_P o tipo A_N , utilizando la siguiente ecuación:²⁹

$$K_{CB} = \frac{\text{pendiente}}{S_0 (1 - \text{pendiente})} \quad (4)$$

donde S_0 es la solubilidad intrínseca del fármaco puro.

Por su parte, para la determinación de las constantes de formación de los complejos ternarios (K_{CT}), la ecuación 4 fue adaptada a partir de la suposición de que la concentración fija de MEG adicionada formaría parte del solvente, manteniéndose como una condición constante en todos los puntos ensayados y, además, S_0 fue sustituida por la concentración del IFA tras la adición de MEG 3 mM (S_{MEG}), resultando en la ecuación 5:

$$K_{CT} = \frac{\text{pendiente}}{S_{MEG} (1 - \text{pendiente})} \quad (5)$$

Además, los incrementos de solubilidad aparente fueron calculados a partir del cociente entre la solubilidad máxima aparente ($S_{m\acute{a}x}$) y S_0 o S_{MEG} .

Por otro lado, con el objetivo de evaluar si el incremento en la solubilidad aparente de SMR debido a la presencia de MEG fue independiente del aumento del pH del medio, los porcentajes de las especies neutras o ionizadas del IFA (ver Figura 1.2) fueron calculadas a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch:⁴⁴

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

2.2.2.1.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN- ¹H)

Los espectros de RMN-¹H, ROESY-2D y 1D, Heteronuclear single quantum coherence (HSQC) y Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) 2D fueron adquiridos a 298 K en un espectrómetro Bruker® Avance II 400 de alta resolución utilizando tubos de 5 mm de diámetro, a 400.16 MHz. De acuerdo a que de los datos obtenidos en los ASF, mediante los cuales se consideró que los complejos presentaban una estequiometría 1:1, los sistemas fueron preparados por la incorporación de una concentración de ligando fija a un exceso de fármaco en D₂O, para alcanzar la mayor solubilidad posible del complejo y poder obtener una concentración cuantificable analíticamente. Para la preparación de los sistemas ternarios se adicionó una concentración fija de MEG de 3 mM. Se procedió de la misma manera para la obtención de las soluciones de los fármacos puros. Los sistemas fueron expuestos a un baño ultrasónico durante 1 h y posteriormente filtrados, previo a su análisis. Los datos de RMN fueron procesados utilizando el programa TOPSPIN 2.0, Bruker®. Las señales fueron calibradas utilizando la señal del solvente residual (4,80 ppm) como referencia interna. Los desplazamiento en los corrimientos químicos, observados en los espectros de RMN-¹H ($\Delta\delta$) de las señales correspondientes a los fármacos o ligandos originados debido a la interacción entre ellos, fueron calculadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\Delta\delta = \delta_T - \delta_F ; \quad \Delta\delta = \delta_T - \delta_B \quad \text{y} \quad \Delta\delta = \delta_T - \delta_M$$

donde δ_F , δ_T , δ_B y δ_M son los corrimientos químicos del fármaco puro, en el complejo ternario y en los binarios con CD y MEG, respectivamente.

2.2.2.2. ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO

2.2.2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS

Los sistemas sólidos binarios y ternarios fueron obtenidos mediante la técnica de liofilización en un equipo Labconco® Freeze Dry 4,5, a -40 ± 1 °C a 50 mbar durante 24 h. De acuerdo a los datos obtenidos en los ASF, se consideró que los complejos presentaban una estequiometría 1:1, por lo cual fueron preparados mediante la incorporación de una concentración de ligando fija a un exceso de fármaco en agua, para alcanzar la mayor solubilidad posible del complejo y poder obtener una concentración cuantificable analíticamente. Se procedió de la misma manera para la obtención de las soluciones de los fármacos puros. Para la preparación de los sistemas ternarios se adicionó una concentración fija de MEG de 3 mM, los cuales fueron expuestos a un baño ultrasónico durante 1 h y posteriormente filtrados previo a su análisis. Luego, se congelaron durante 24 h, para asegurar la total solidificación, antes de comenzar el proceso de liofilización.

Por otra parte, las mezclas físicas fueron preparadas en las mismas relaciones molares que los correspondientes sistemas liofilizados. Se realizó un simple amasado en seco de los componentes previamente liofilizados, en mortero de ágata, hasta obtener un sólido homogéneo.

2.2.2.2.2. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA (IR)

Los espectros IR de las sustancias puras, de los complejos liofilizados y de las mezclas físicas fueron adquiridos disponiendo las muestras sólidas en pastillas de KBr, en un espectrofotómetro Nicolet® 5 SXC FT-IR. Los cambios en las señales, pertenecientes a los grupos funcionales más representativos en cada molécula, fueron analizados para inferir el modo de interacción entre los fármacos y los ligandos.

2.2.2.2.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

El comportamiento térmico de los fármacos puros y de los complejos fue estudiado mediante el calentamiento de las muestras en cápsulas de aluminio herméticas perforadas, bajo una atmósfera de nitrógeno, en un rango de temperatura comprendido entre 25 y 350 °C y a una velocidad de calentamiento de 10 °C min^{-1} . Las muestras que contenían MEG fueron analizadas en un rango de temperaturas de 25–200 °C debido a la prematura degradación térmica que sufre este compuesto. Las curvas de DSC y TGA fueron obtenidas en un equipo DSC TA 2920 y TGA TA 2920, respectivamente.

2.2.2.2.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X de polvos de las sustancias puras, de los complejos liofilizados y de las mezclas físicas fueron obtenidos utilizando un equipo Rikugu®, modelo Dmax 2500 PC, en un rango de 2θ entre 4° y 50° utilizando radiación de Cu Ka ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) a una velocidad de barrido de $0,05^\circ/\text{min}$ y bajo condiciones de temperatura ambientales.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. COMPLEJOS BINARIOS CON CICLODEXTRINAS Y MEGLUMINA

2.3.1.1. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN

2.3.1.1.1. ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FASES (ASF)

Los Diagramas de Solubilidad de Fases en agua, y en soluciones reguladoras de pH 2,0 y 8,0, de SMR con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG y de INM con β -CD, M- β -CD e HP- β -CD se muestran en las Figuras 2.6 y 2.7, respectivamente. El sistema de INM con MEG no fue tenido en consideración para su estudio debido a que ensayos preliminares demostraron que MEG posee un efecto negativo sobre la estabilidad de INM.

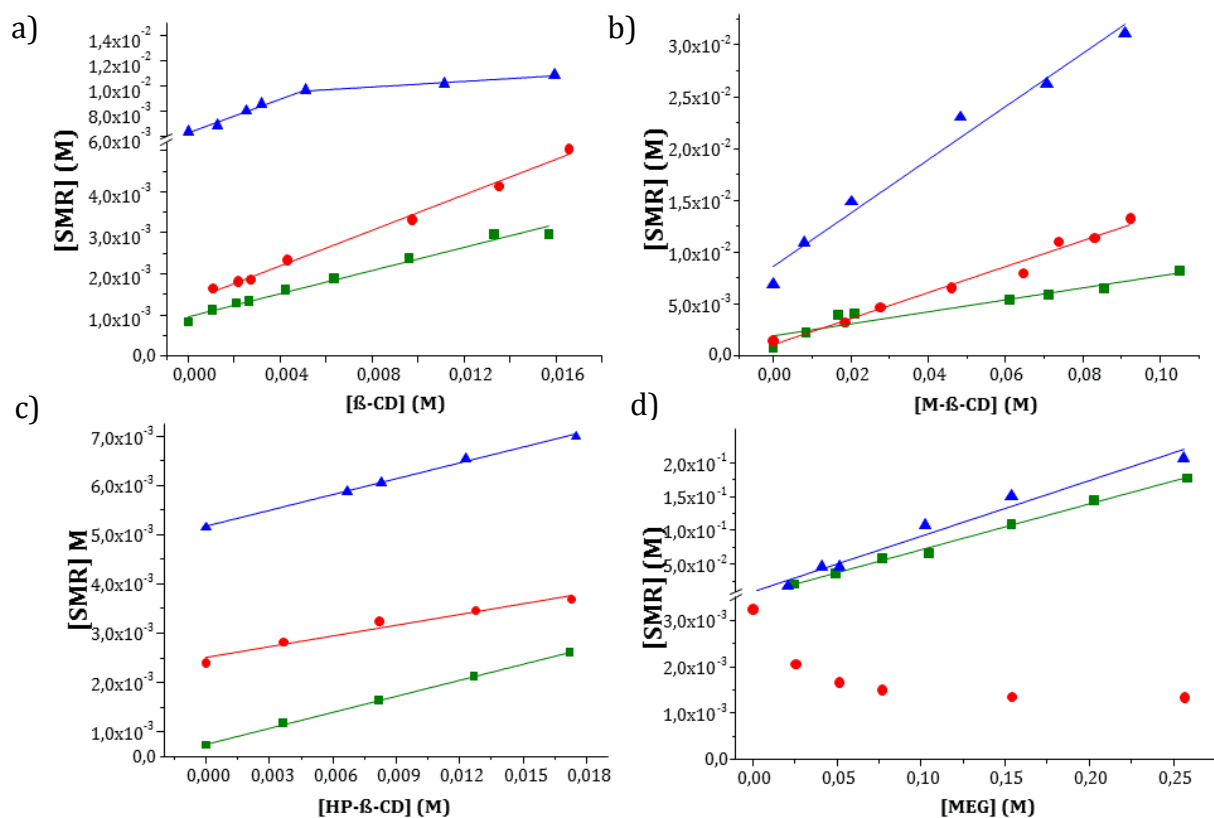


Figura 2.6. Diagramas de Solubilidad de Fases de SMR con: a) β -CD; b) M- β -CD; c) HP- β -CD; d) MEG, en agua (■), a pH 2 (●) y a pH 8 (▲) a 25 °C.

En general, la mayoría de las isotermas pueden ser clasificadas como tipo A_L, de acuerdo al modelo de Higuchi y Connors.²⁹ Como puede observarse en los diagramas, la solubilidad acuosa de los fármacos aumenta linealmente en función de la concentración de ligando, a la vez que las isotermas presentan valores de pendiente menores a 1, indicando la formación de complejos, fármaco:CD y SMR:MEG, de estequiometría 1:1, conforme a los resultados de ASF publicados por diferentes autores para diversos IFA.^{21,45-48}

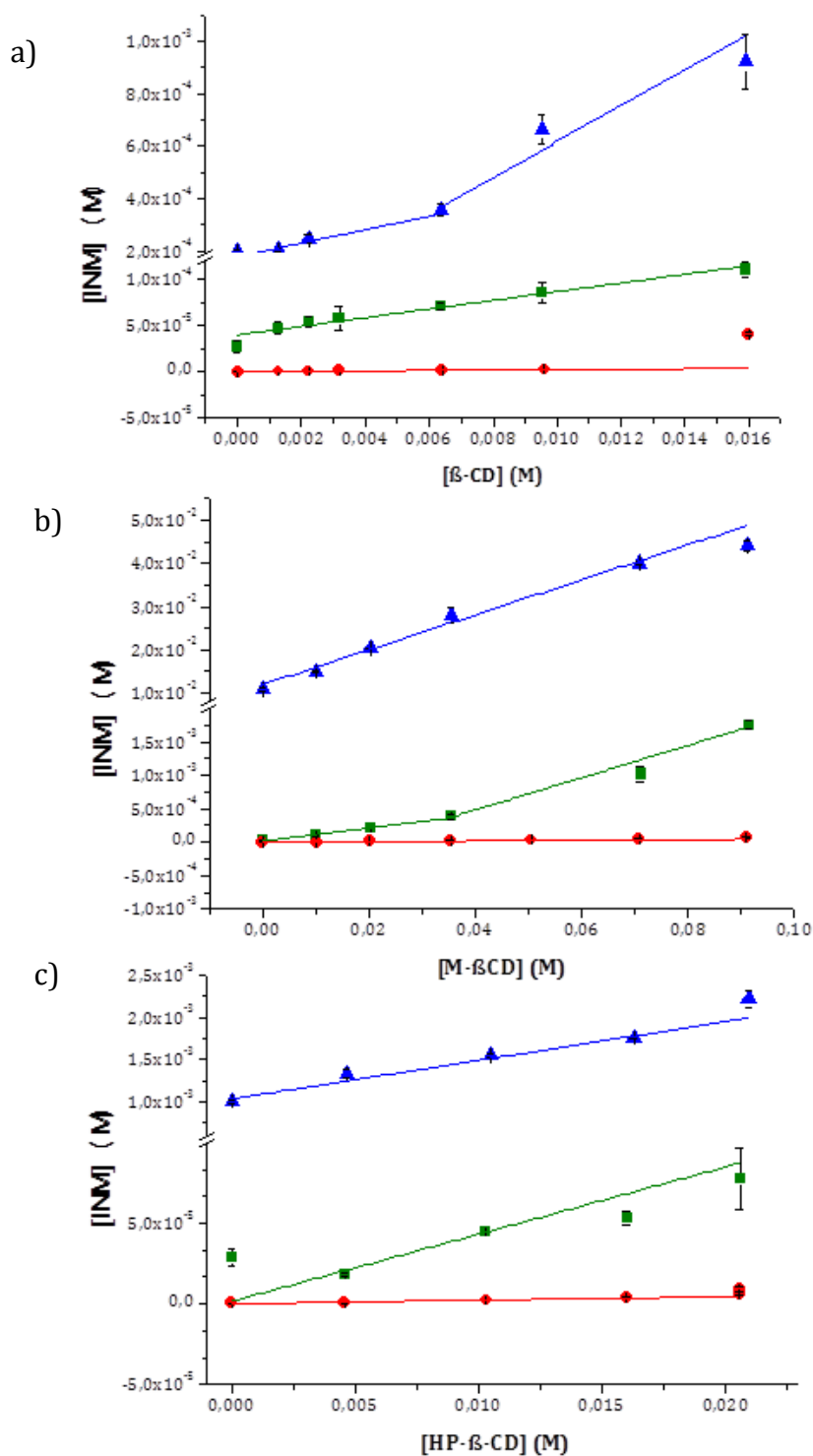


Figura 2.7. Diagramas de Solubilidad de Fases de INM con: a) β -CD; b) M- β -CD; c) HP- β -CD, en agua (■), a pH 2 (●) y a pH 8 (▲) a 25 °C.

Como excepción, la isoterma de SMR con β -CD, en solución de pH 8,0, resultó ser de tipo A_N, lo que podría asociarse a la auto-agregación de la CD o a una alteración de la naturaleza efectiva del solvente en presencia de concentraciones altas de ligando, afectando el grado de complejación aparente, de acuerdo a lo manifestado en el trabajo de Brewster y

Loftsson.³⁰ Por otro lado, el diagrama de INM:β-CD a pH 8,0 fue de tipo A_P, sugiriendo la formación de complejos de orden superior a altas concentraciones de β-CD.

Tabla 2.1. Valores de solubilidad intrínseca (S_0), solubilidades máximas ($S_{máx}$), constantes de estabilidad aparente (K_c) e incrementos de solubilidad ($S_{máx}/S_0$) de: **a)** Sulfamerazina y **b)** Indometacina, obtenidos a partir de los estudios de Análisis de Solubilidad de Fases.

a)		agua	pH 2	pH 8
SMR	S_0 (mg/mL)	0,22 ± 0,04	0,32 ± 0,06	1,6 ± 0,2
SMR:β-CD	$S_{máx}$ (mg/mL)	0,83 ± 0,02	1,15 ± 0,08	3,768 ± 0,007
	K_c (M ⁻¹)	198 ± 22	207 ± 45	31 ± 8
	$S_{máx}/S_0$	3,20	3,59	2,4
SMR:M-β-CD	$S_{máx}$ (mg/mL)	2,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1	8,1 ± 0,3
	K_c (M ⁻¹)	73 ± 21	118 ± 29	59 ± 13
	$S_{máx}/S_0$	10,0	10,9	11
SMR:HP-β-CD	$S_{máx}$ (mg/mL)	0,69 ± 0,08	0,99 ± 0,01	1,9 ± 0,3
	K_c (M ⁻¹)	144 ± 26	65 ± 17	20 ± 4
	$S_{máx}/S_0$	3,14	3,06	1,2
SMR:MEG	$S_{máx}$ (mg/mL)	46,8 ± 0,3	0,350 ± 0,001	54,8 ± 0,4
	$S_{máx}/S_0$	212,73	1,09	34,3

b)		agua	pH 2	pH 8
INM	S_0 (mg/mL)	0,010 ± 0,003	(8 ± 0,4) × 10 ⁻⁵	3,9 ± 0,2
INM:β-CD	$S_{máx}$ (mg/mL)	0,039 ± 0,003	0,0145 ± 0,0005	0,33 ± 0,04
	K_c (M ⁻¹)	173 ± 47	848 ± 77	133 ± 7
	$S_{máx}/S_0$	1,4	9,4	0,8
INM:M-β-CD	$S_{máx}$ (mg/mL)	0,63 ± 0,02	0,026 ± 0,002	15,8 ± 0,4
	K_c (M ⁻¹)	15 ± 7	2326 ± 115	63 ± 7
	$S_{máx}/S_0$	649,0	321,7	4,1
INM:HP-β-CD	$S_{máx}$ (mg/mL)	0,028 ± 0,007	(3,4 ± 0,6) × 10 ⁻³	0,08 ± 0,04
	K_c (M ⁻¹)	147 ± 38	940 ± 58	48 ± 5
	$S_{máx}/S_0$	2,7	42,0	2,2

Por otra parte, el sistema SMR:MEG en solución acuosa de pH 2,0 presentó una disminución en la concentración de SMR en función de la de MEG, lo que podría deberse a que los grupos amino de ambos se encuentran protonados en este medio [$pK_{a(SMR \text{ amino})} = 2,6$;⁴⁹ $pK_{a(MEG)} = 9,5$ ⁵⁰], provocando repulsión electrostática y de esta manera desfavoreciendo la formación de un sistema binario. Las constantes de formación de los complejos binarios fármaco:CD (K_{CB}), calculadas a partir de las pendientes de los diagramas de solubilidad, las solubilidades máximas aparentes ($S_{máx}$) y los incrementos de solubilidad ($S_{máx}/S_0$) para todos los sistemas son presentados en la Tabla 2.1. A partir de estos valores, fue posible deducir diferentes interacciones entre los fármacos y los ligandos.

Tanto la interacción de SMR como de INM con las CD se produjo de manera más eficiente a pH 2,0, evidenciada por valores de K_{CB} mayores e incrementos superiores de solubilidad en este medio. Este comportamiento es principalmente debido a que el grupo sulfonamida de SMR y el grupo carboxilo de INM son ácidos débiles, los que se encuentran

mayoritariamente en sus formas no ionizada en estas condiciones, lo que se condice con lo reportado en la literatura, que establece que la complejación de fármacos con ciclodextrinas ocurre de manera más eficiente cuando los principios activos se encuentran no ionizados,^{23,51} a la vez que sugiere la incorporación dentro de la cavidad lipofílica de los oligosacáridos cíclicos. Sin embargo, las mayores solubilidades fueron obtenidas a pH 8, cuando los grupos ácidos se encontraban totalmente ionizados, debido a la más alta solubilidad aparente de los IFA. Un comportamiento similar fue observado para SMR en presencia de MEG. De acuerdo a estos resultados, fue posible la obtención de una mayor solubilidad de los fármacos mediante la combinación de las estrategias de regulación del pH y complejación con β -CD, M- β -CD e HP- β -CD, o a la formación de sistemas binarios de SMR con MEG. Por el contrario, la interacción de SMR con HP- β -CD mostró una menor efectividad cuando se utilizaron soluciones reguladoras de pH, lo que podría estar asociado a la formación de sales, debido a que el efecto de un tercer componente podría ocasionar impedimentos estéricos del fármaco dentro de la cavidad, actuando como un regulador del espacio. Cabe destacar que la solubilidad obtenida a partir del sistema SMR:MEG fue mayor que la que podría haberse esperado debido únicamente a la modulación del pH, ya que con la mayor concentración de MEG utilizada, el pH alcanzó un valor de 9,5 y el porcentaje de la especie aniónica de SMR, calculada a partir de la ecuación de Henderson–Hasselbalch (Tabla 2.2), es cercano al 100% a los valores de pH alcanzados tras la adición de las cantidades de MEG utilizadas en estos ensayos (pH entre 8,75 y 9,5) y aun así la solubilidad continuó aumentando. En base a estos resultados, podemos concluir que el aumento en la solubilidad de SMR podría deberse a un mecanismo que involucra la formación de un par iónico fuerte entre el fármaco y MEG. A pH 8,0 se obtuvieron los mayores valores de solubilidad de los fármacos, tanto con las CD como con MEG, sugiriendo que la combinación de la complejación con la regulación de pH es una buena estrategia para modular la solubilidad a los IFA. M- β -CD demostró conferir una mayor solubilidad de los fármacos que β -CD o HP- β -CD ($S_{\text{máx, pH 8 SMR}} = 8,1 \text{ mg/mL}$; $\text{INM} = 15,8 \text{ mg/mL}$). A su vez, MEG concedió una mayor solubilidad de SMR que las CD ($S_{\text{máx, pH 8}} = 54,8 \text{ mg/mL}$).

Tabla 2.2. Porcentajes de ionización de Sulfamerazina calculados a partir de la Ecuación de Hendersson- Hasselbach, a diferentes valores de pH obtenidos tras la adición de concentraciones crecientes de MEG.

Medio	pH 2,0			Agua			pH 8,0		
[MEG]/M	pH	%(BH+)	%(A-)	[MEG]/M	pH	%(A-)	[MEG]/M	pH	%(A-)
0,0000	2,07	49,42	0,0015	0,0000	6,26	18,47	0,0000	7,83	90,38
0,0257	2,21	41,45	0,0021	0,0246	8,75	99,59	0,0205	8,40	97,90
0,0513	2,36	33,39	0,0029	0,0492	9,03	100,25	0,0410	8,87	99,93
0,0770	2,57	23,61	0,0047	0,0768	9,19	100,48	0,0513	8,92	100,05
0,1027	2,87	13,41	0,0094	0,1045	9,27	100,57	0,1026	9,60	100,80
0,1540	5,36	0,05	2,83	0,1537	9,40	100,68	0,1539	9,50	100,75
0,2567	6,38	0,0048	23,43	0,2028	9,50	100,75	0,2565	10,00	100,92

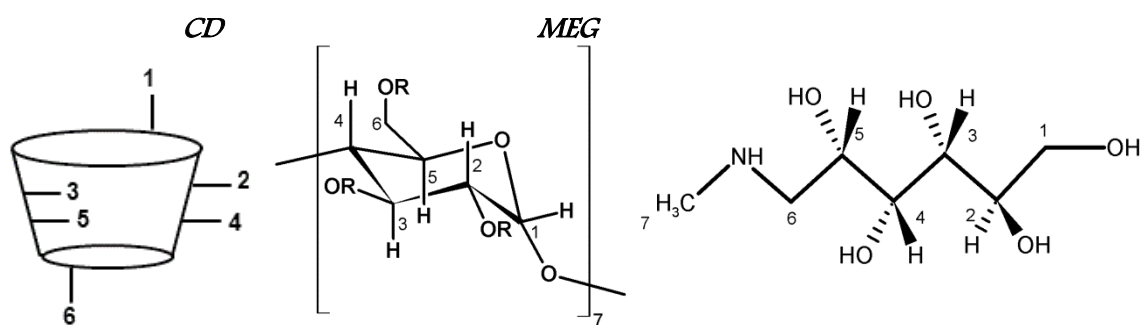
Ver Figuras 1.2 y 1.4 para equilibrios de ionización de SMR e INM, respectivamente.

2.3.1.1.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN-¹H) Y ROESY.

Los espectros de RMN-¹H son una de las herramientas más eficientes para evidenciar en forma directa la formación de complejos de inclusión, ya que la magnitud de los desplazamientos de los protones presentes dentro de la cavidad puede ser utilizada como una medida de la estabilidad del complejo y de la profundidad de inclusión.^{52,53} Los corrimientos químicos de los protones alifáticos de β-CD, M-β-CD, HP-β-CD y MEG y de los protones aromáticos de SMR e INM fueron determinados en D₂O antes y después de la complejación y son presentados en las Tablas 2.3 y 2.4, respectivamente. Las asignaciones de las señales de los protones de β-CD,² M-β-CD,⁵⁴ HP-β-CD,⁵⁵ MEG ⁵⁶ y SMR ⁵⁷ fueron realizadas en base a publicaciones previas.

En este estudio, los protones internos de la cavidad de M-β-CD e HP-β-CD, H₃ y H₅, presentaron los desplazamientos más significativos hacia campos bajos, como también el protón H₆ de M-β-CD, que se localiza en la apertura angosta de la cavidad de la CD. Por otro lado, los desplazamientos químicos relativamente bajos exhibidos por los protones de la superficie externa de la CD (H₁, H₂ y H₄), indicaron interacciones débiles o nulas con la molécula huésped. Además, casi todos los protones de SMR o INM fueron modificados debido a la complejación, presentando desplazamientos, tanto hacia campos altos como hacia campos bajos, probablemente debido a interacciones tipo Van der Waals ⁵⁸ entre el fármaco y el interior hidrofóbico de las CD. Para los sistemas conteniendo SMR, los desplazamientos más significativos fueron observados para los protones H_A, H_C y H_E, que se encuentran ubicados en la posición meta al grupo sulfonamida, presentando menor densidad electrónica, lo que les otorga una mayor afinidad por la cavidad interna de la CD. También, estos hallazgos indican la inclusión de la molécula entera dentro de la cavidad del ligando. Un comportamiento similar fue observado para los sistemas conteniendo INM, ya que los protones que presentaron los desplazamientos más significativos hacia campos bajos fueron H_C and H_E, ubicados en posiciones orto al grupo metoxilo donador de electrones, presentando menor densidad electrónica, lo que les otorga una mayor afinidad por la cavidad interna de la CD. Los protones H_A, H_B y H_D también presentaron corrimientos químicos de menor magnitud, sugiriendo la incorporación de la molécula entera dentro de la cavidad del ligando.

Tabla 2.3. Corrimientos químicos de cada ligando en presencia de: a) SMR; b) INM.



a)

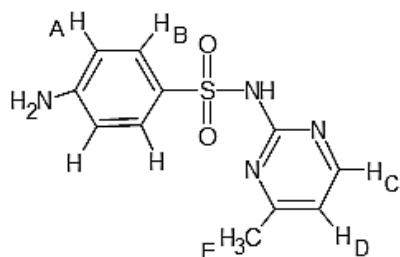
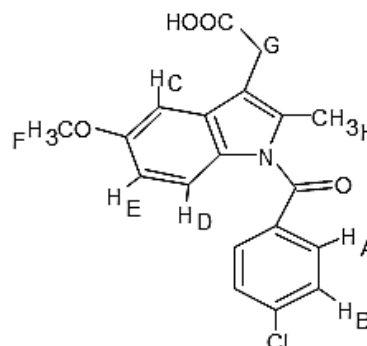
	SMR:βCD			SMR:MβCD			SMR:HPβCD			SMR:MEG		
	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$
H ₁	5,068	5,118	0,051	5,251	5,245	-0,006	5,252	5,237	-0,015	3,724	3,731	0,007
H _{1a}	/	/	/	5,064	5,058	-0,006	5,098	5,089	-0,009	/	/	/
H ₂	3,647	3,430	-0,217	superposición con H ₄			3,649	3,630	-0,019	3,867	4,050	0,183
H _{2a}	/	/	/	3,384	3,399	0,015	/	/	/	/	/	/
H ₃	3,965	3,995	0,030	4,008	3,995	-0,013	3,984	4,046	0,062	3,792	3,740	-0,052
H _{3a}	/	/	/	3,928	3,954	0,026	/	/	/	/	/	/
H ₄	3,584	3,632	0,049	superposición con H ₂			3,521	3,526	0,004	3,606	3,622	0,016
H ₅	3,851	3,871	0,021	3,670	3,799	0,129	3,745	3,848	0,102	/	/	/
H ₆	3,877	3,922	0,044	3,862	3,888	0,025	3,895	3,893	-0,002	2,644	3,162	0,518
H ₇	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2,325	2,731	0,406
OCH ₃	/	/	/	3,552	3,579	0,027	/	/	/	/	/	/

b)

	INM:βCD			INM:MβCD			INM:HPβCD		
	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$	δ_L	δ_C	$\Delta\delta$
H ₁	5,068	5,095	0,027	5,251	5,256	0,006	5,252	5,25	-0,002
H _{1a}	/	/	/	5,064	5,074	0,010	5,098	5,103	0,005
H ₂	3,647	3,673	0,026	superposición con H ₄			3,649	3,638	-0,011
H _{2a}	/	/	/	3,862	3,399	-0,463	/	/	/
H ₃	3,965	3,972	0,007	4,008	3,955	-0,053	3,984	4,037	0,053
H _{3a}	/	/	/	3,928	3,915	-0,014	/	/	/
H ₄	3,584	3,61	0,026	superposición con H ₂			3,521	3,526	0,004
H ₅	3,851	3,851	8x10 ⁻⁴	3,67	3,840	0,170	3,745	3,856	0,110
H ₆	3,877	3,902	0,024	3,862	3,875	0,279	3,895	3,902	0,007
OCH ₃	/	/	/	3,552	3,567	0,015	/	/	/

L: ligando; C: complejo; a: posición metilada; /: no corresponde asignación de señal.

Tabla 2.4. Corrimientos químicos de: **a)** SMR en presencia de ciclodextrinas y Meglumina y de: **b)** INM en presencia de ciclodextrinas.

SMR

INM

a)

δ_{SMR}	SMR: β -CD		SMR:M- β -CD		SMR:HP- β -CD		SMR:MEG		
	δ_c	$\Delta\delta$	δ_c	$\Delta\delta$	δ_c	$\Delta\delta$	δ_c	$\Delta\delta$	
H_A	8,1764	8,3176	0,1412	8,3406	0,1624	8,2656	0,0892	8,029	-0,1474
H_B	7,7369	7,7968	0,0599	7,753	0,0161	7,7543	0,0174	7,6342	-0,1027
H_C	6,867	6,9471	0,081	6,9449	0,0779	6,8932	0,0262	6,7889	-0,0781
H_D	6,8091	6,8322	0,0231	6,6426	-0,1665	6,8034	-0,006	6,6471	-0,162
H_E	2,3901	2,4765	0,0844	2,4522	0,0621	2,4323	0,0422	2,2701	-0,12

b)

δ_{INM}	INM: β -CD		INM:M- β -CD		INM:HP- β -CD		
	δ_c	$\Delta\delta$	δ_c	$\Delta\delta$	δ_c	$\Delta\delta$	
H_A	7,7464	7,7329	-0,0135	7,7000	-0,0464	7,8055	0,0591
H_B	7,6335	7,6259	-0,0076	7,5780	-0,0555	7,7534	0,1199
H_C	7,1147	7,518	0,4033	7,4644	0,3497	7,3975	0,2828
H_D	7,1006	7,1554	0,0548	7,1283	0,0277	7,1674	0,0668
H_E	6,7834	6,9458	0,1624	6,9058	0,1224	6,9229	0,1395
H_F	3,9020	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
H_G	3,6100	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
H_H	2,2563	2,1132	-0,1431	2,1129	-0,1434	2,215	-0,041

C: complejo; ϕ : señal indistinguible

La técnica de RMN ROESY es frecuentemente utilizada para establecer la interacción entre la molécula huésped y la molécula portadora en el estudio de complejos supramoleculares.^{59,60} En los espectros ROESY 2D de β -CD, M- β -CD e HP- β -CD con SMR (Figura 2.8), es posible observar picos de cruce intermoleculares de H_B con H₅ y también con H₃ en SMR:M- β -CD y de H_D con H₅ en SMR: β -CD, indicando claramente la inclusión de SMR, donde los protones de la cavidad (H₃ y H₅) se encuentran afectados por apantallamiento anisotrópico debido al grupo sulfonamida e interacciones de tipo Van der Waals.

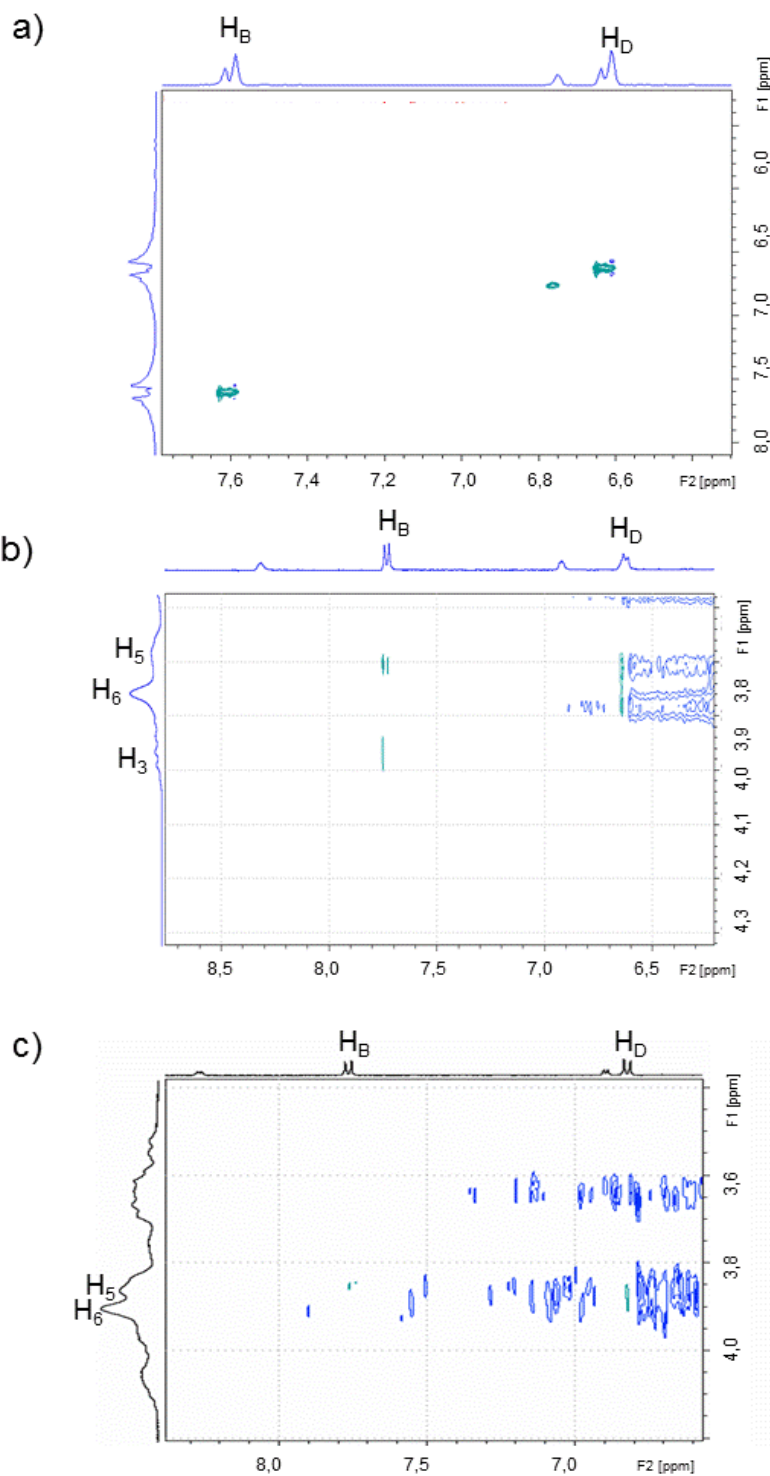


Figura 2.8. Contornos parciales de los espectros ROESY 2D de: a) SMR: β -CD; b) SMR:M- β -CD y c) SMR:HP- β -CD en D₂O a 25 °C.

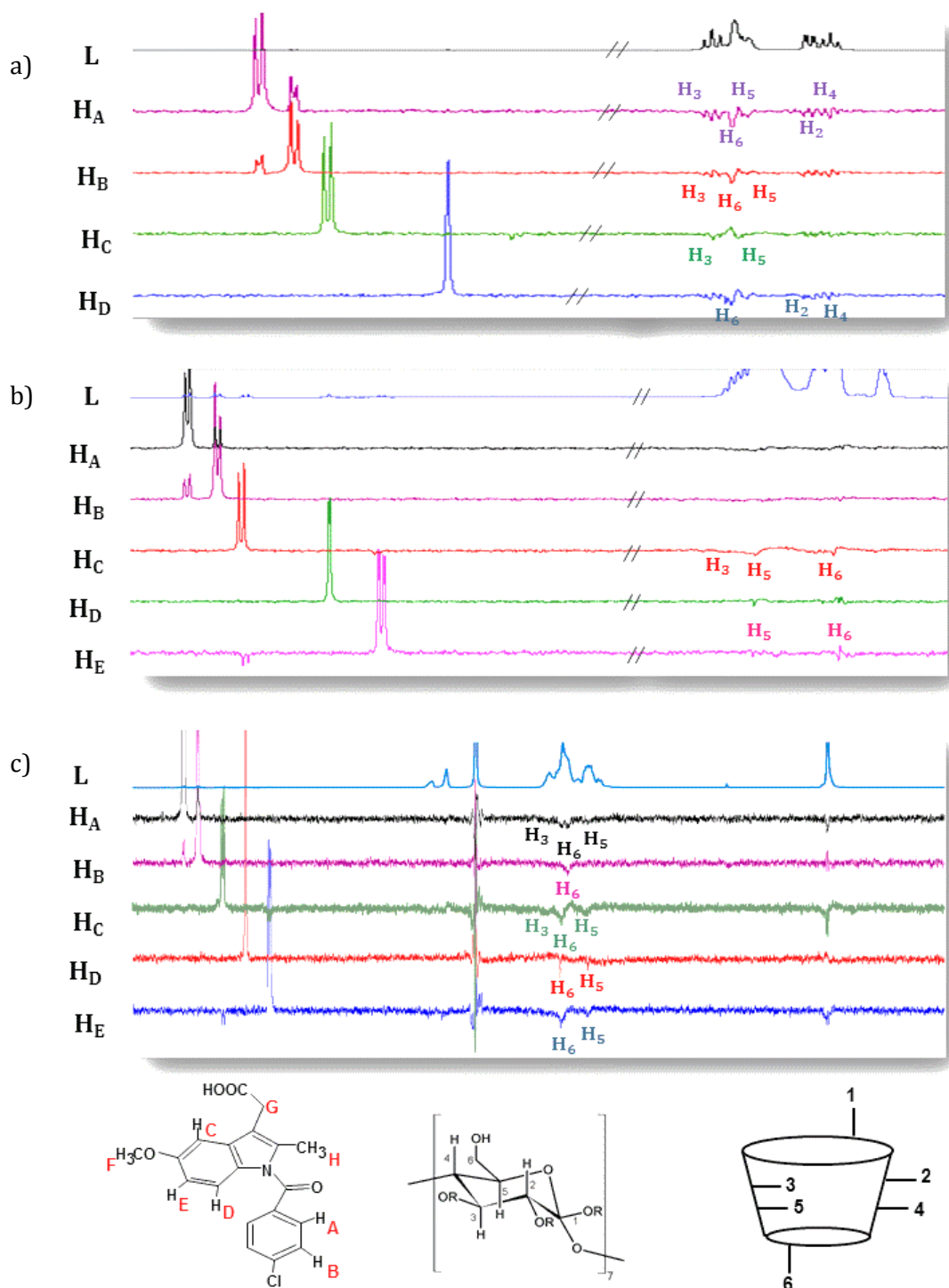


Figura 2.9. Espectros ROESY 1D de: a) INM:β-CD; b) INM:M-β-CD y c) INM:HP-β-CD en D₂O a 25 °C.

Por otro lado, para establecer el tipo de interacción entre INM y las CD, se obtuvieron los espectros ROESY 1D, debido a que posibilitan la adquisición de un mayor número de ciclos y, por lo tanto, la visualización de señales de mayor intensidad (Figura 2.9). En los espectros fue posible observar la interacción de los protones de la cavidad interna de las CD (H₃ y H₅) y del protón ubicado hacia la apertura angosta de las mismas (H₆) con los protones de INM (H_A, H_B para INM:β-CD e INM:HP-β-CD, H_C para los tres complejos y H_E para INM:M-β-CD e INM:HP-β-CD), sugiriendo la inclusión total en el caso

de los complejos con β -CD y M- β -CD, y parcial en el complejo con HP- β -CD, con orientación hacia la apertura angosta de la cavidad.

En el espectro RMN- ^1H de SMR:MEG, fueron observados desplazamientos hacia campos bajos de H_6 y H_7 , pertenecientes a MEG y desplazamientos hacia campos bajos de todos los protones de SMR, sugiriendo la existencia de interacciones electrostáticas, ya que el grupo amino ocasiona un apantallamiento de los protones de SMR próximos al grupo sulfonamida. Además, el desplazamientos hacia campos bajos del protón H_2 de MEG podría indicar también la presencia de interacciones de tipo Van der Waals. El espectro ROESY 2D de SMR:MEG (Figura 2.10) confirmó estas interacciones, ya que H_B y H_E presentaron picos de cruce con H_2 y H_6 , a la vez que H_E con H_7 . En base a estos resultados, proponemos que un sistema binario entre SMR y MEG fue formado, donde no solo se llevan a cabo interacciones electrostáticas, sino que también se encuentran implicadas interacciones de tipo Van der Waals.

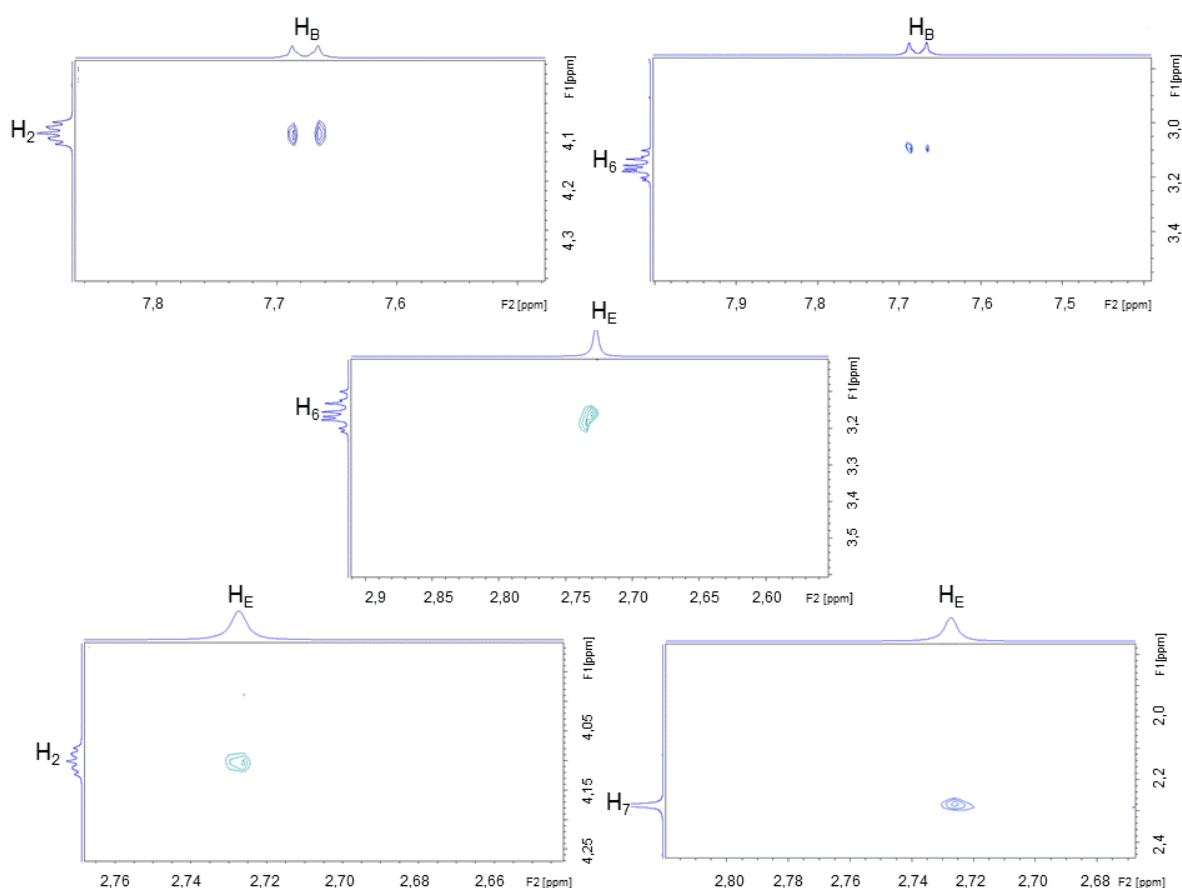


Figura 2.10. Contornos parciales de los espectros ROESY 2D del sistema binario SMR:MEG en D_2O a 25°C .

2.3.1.2. ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO

Se procedió a la caracterización de las sustancias puras y de los sistemas sólidos binarios obtenidos por liofilización (SBL), así como también de las mezclas físicas de los componentes liofilizados (MFB), obtenidas por amasado, mediante Espectrometría Infrarroja, Análisis Térmico y Difracción de Rayos X.

2.3.1.2.1. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA (IR)

Con el objetivo de determinar la interacción entre los fármacos y las CD y entre SMR y MEG, en estado sólido, la metodología de Espectrofotometría Infrarroja fue utilizada, a partir del análisis de los cambios en las formas, desplazamientos e intensidad de los picos de absorción IR del huésped o portador, ya que otorgan información acerca de la formación de complejos de inclusión.⁶¹ Los espectros IR de las sustancias puras, sistemas liofilizados (SBL) y mezclas físicas (MFB) de SMR e INM con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y de SMR con MEG fueron adquiridos y se presentan en las Figura 2.11 y 2.12, respectivamente.

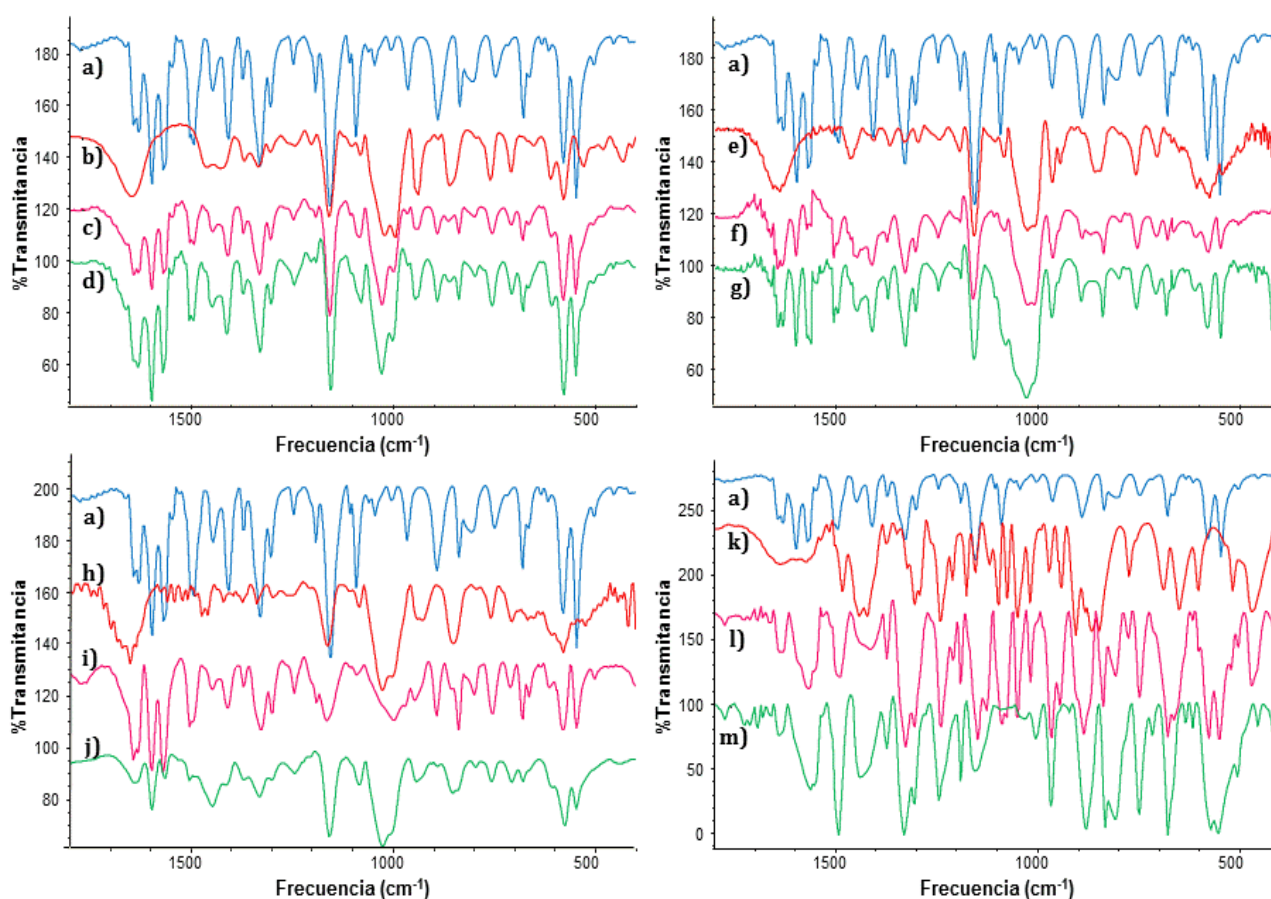


Figura 2.11. Espectros IR de: a) pura SMR; b) β -CD pura; c) MFB SMR: β -CD 1:1; d) SBL SMR: β -CD 1:1; e) M- β -CD pura; f) MFB SMR:M- β -CD 1:1; g) SBL SMR:M- β -CD 1:1; h) HP- β -CD pura; i) MFB SMR:HP- β -CD 1:1; j) SBL SMR:HP- β -CD 1:1; k) MEG puro; l) MFB SMR:MEG 1:1; m) SBL SMR:MEG 1:1.

Las bandas características de SMR presentaron cambios debido a la presencia de CD y MEG, tales como las señales correspondientes a la vibración del anillo aromático (1642 y 1630 cm^{-1}) cuyas relaciones de intensidades fueron modificadas en los SBL con β -CD y M- β -CD, o desaparecieron en el SBL con HP- β -CD. Además, se observaron cambios en las intensidades de los picos a 1596 y 1555 cm^{-1} . También, las intensidades relativas de los picos de los estiramientos simétricos y asimétricos de SO_2 (1327 y 1303 cm^{-1}) fueron modificadas en los SBL con MEG e HP- β -CD y la banda de estiramiento del enlace $\text{S}=\text{O}$ (1092 cm^{-1}) presentó un desplazamiento hacia menores frecuencias en la MFB y el SBL de SMR: β -CD (1087 y 1090 cm^{-1} , respectivamente). En adición, se observó que otras señales, ubicadas en la región de la huella digital de SMR, presentaron inversión en las intensidades relativas o presentaron desplazamientos hacia menores frecuencias en el SBL en comparación con la MFB de los sistema de SMR con M- β -CD, HP- β -CD y MEG. Por otro lado, la banda de MEG, correspondiente a la vibración en el plano del enlace O-H, fue desplazada hacia mayores frecuencias (de 1239 a 1245 cm^{-1}) debido a la presencia de SMR en el SBL. Las diferencias entre las MFB y los SBL sugieren la formación de verdaderos complejos de SMR con las CD y de un sistema binario con MEG cuando los sistemas fueron preparados mediante el método de liofilización, en los que se vieron involucrados principalmente el anillo aromático y el grupo sulfonamida en la interacción de SMR con las CD, así como el grupo sulfonamida en la interacción con MEG.

Por otro lado, las bandas características de INM presentaron cambios debido a la presencia de las CD, tales como las señales correspondientes al estiramiento del enlace carbonilo presentes en las MFB con M- β -CD (1717 y 1690 cm^{-1}) e HP- β -CD (1743 y 1688 cm^{-1}) que presentaron desplazamientos (1731 y 1694 cm^{-1}) en los SBL con M- β -CD y desaparecieron en los SBL con HP- β -CD. Además, bandas de absorción correspondientes a la vibración del anillo aromático presentes en las MFB con β -CD (1477 ; 1470 ; 1456 ; 1423 ; 1412 ; 1398 , 1370 ; 1359 ; 1324 ; 1292 ; 1261 ; 1233 ; 1224 ; 1188 cm^{-1}), M- β -CD (1324 ; 1305 ; 1290 cm^{-1}) e HP- β -CD (1186 ; 1149 cm^{-1}) desaparecieron en los correspondientes SBL, o se observaron picos en las MFB con M- β -CD (1233 y 1222 cm^{-1}) e HP- β -CD (1477 y $1454/1368$ y $1359/1260$; 1232 y $1222/1065$; 1065 y 1001 cm^{-1}) que se fusionaron en una banda ancha (1227 cm^{-1} y $1460/1365/1260/1031\text{ cm}^{-1}$, respectivamente) o presentaron desplazamientos (1191 a 1195 cm^{-1} y 1306 a $1308/1164$ a 1156 cm^{-1} , respectivamente) en los SBL. En adición, bandas de absorción correspondientes a la vibración de enlace C-H fuera del plano $\text{C}=\text{C}$ presentes en las MFB con β -CD (905 ; 855 ; 804 ; 736 cm^{-1}), M- β -CD (737 ; 690 cm^{-1}) e HP- β -CD (925 ; 801 ; 737 ; 689 ; 656 cm^{-1}), desaparecieron en los correspondientes SBL, a la vez que se observaron señales presentes en las MFB con β -CD (946 ; 935 y $926/704$ y 692 cm^{-1}) e HP- β -CD (853 y 837 cm^{-1}) que se fusionaron en una sola banda ($944/701\text{ cm}^{-1}$ y 853 cm^{-1} , respectivamente) y se detectaron desplazamientos en los SBL de β -CD (838 a 833 cm^{-1} y 752 a 757 cm^{-1}), M- β -CD (840 a 833 cm^{-1}) e HP- β -CD (904 a 889 cm^{-1} y 756 a 753 cm^{-1}) respecto a las correspondientes MFB. También, se registró ausencia de señales ubicadas en la región de la huella digital de las MFB con β -CD (599 y 562 cm^{-1}) e HP- β -CD (562 ; 480 ; 431 cm^{-1}) o desplazamiento de picos en la MFB de HP- β -CD (585 a 581 cm^{-1}) respecto a los SBL. Las diferencias entre las MFB y los SBL sugiere la formación de verdaderos complejos de INM con las CD cuando son preparados mediante el método de

liofilización, en los que se ven involucrados principalmente los dos anillos aromáticos y el grupo carbonilo de INM.

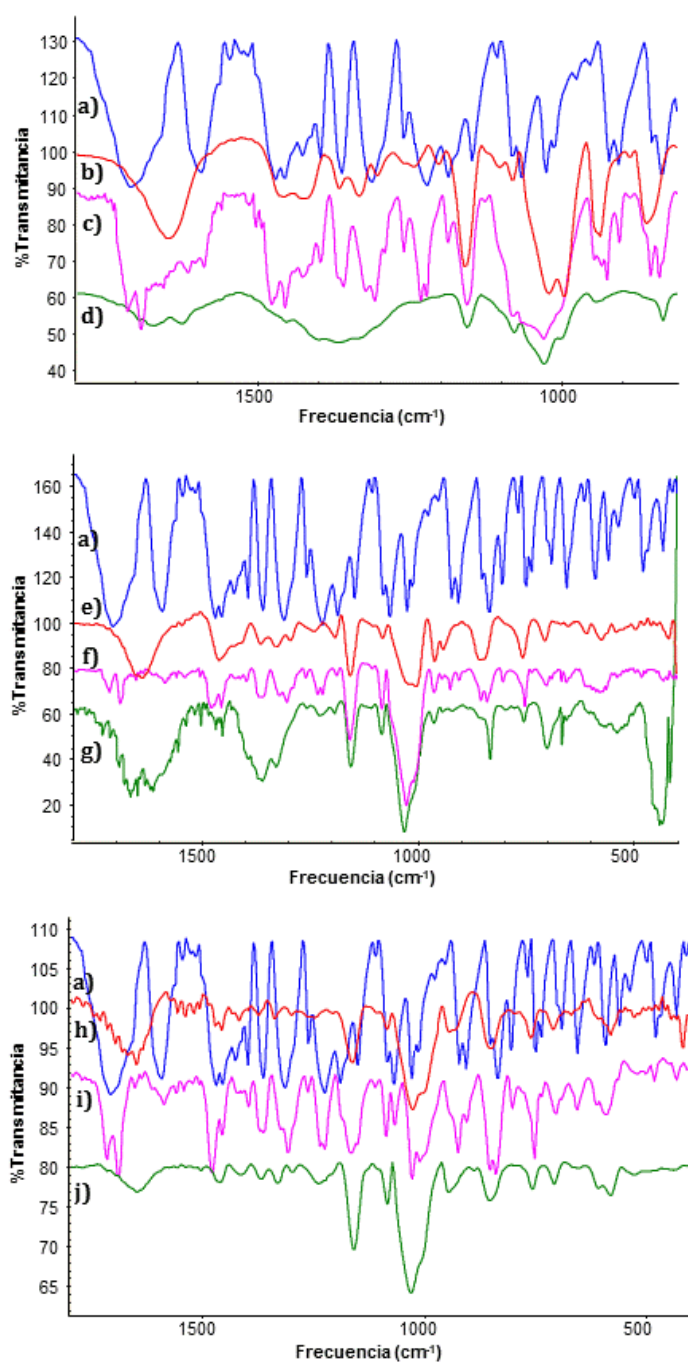


Figura 2.12. Espectros IR de: a) INM pura; b) β -CD pura; c) MFB INM: β -CD 1:1; d) SBL INM: β -CD 1:1; e) M- β -CD pura; f) MFB INM:M- β -CD 1:1; g) SBL INM:M- β -CD 1:1; h) HP- β -CD pura; i) MFB INM:HP- β -CD 1:1; j) SBL INM:HP- β -CD 1:1.

2.3.1.2.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC), ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA) Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO DIFERENCIAL (DTG).

DSC, TGA y DTG son frecuentemente las técnicas de análisis térmico farmacéutico de elección para el estudio de complejación, debido a que proveen información detallada acerca de las propiedades energéticas y físicas de las sustancias.⁶¹ En las Figuras 2.13, 2.14, 2.15 y 2.16 se ilustran los termogramas de los fármacos puros, de las CD, de MEG, y de las MFB y de los correspondientes SBL de SMR con β -CD y M- β -CD, de SMR con HP- β -CD y MEG y de INM con β -CD, M- β -CD e HP- β -CD, respectivamente, así como los datos más relevantes se resumen en la Tabla 2.5.

Las curvas de SMR e INM [Figuras 2.13 a) y 2.15 a), respectivamente] presentaron las características típicas de sustancias cristalinas, caracterizadas por presentar picos agudos endotérmicos (a 237,71 y 161,77 °C, respectivamente), asignados a sus puntos de fusión, y descomponiéndose por encima de los 270 y 250 °C, respectivamente. Como puede observarse, mediante la comparación de las curvas de TGA y DSC, las CD presentan deshidratación en el rango de 25 a 150 °C y se descomponen por encima de los 250 °C, evidenciado por la pérdida de masa en las curvas de TGA. Las MFB de las CD con SMR (Figuras 2.13 y 2.14) presentaron picos endotérmicos debido al punto de fusión del fármaco, seguido de descomposición, representado por una pérdida de masa continua en las curvas de TGA, como también, estas curvas presentaron desplazamientos de temperatura y cambios en los valores de pérdida de masa del evento de deshidratación. Además, en la MFB de SMR:HP- β -CD [Figura 2.14 a)], el pico de fusión de SMR se encuentra ligeramente desplazado hacia menores temperaturas. En registros de los DSC y TGA de las MFB de INM con β -CD, M- β -CD e HP- β -CD (Figuras 2.15 y 2.16) se registraron la endoterma de fusión de INM y su descomposición evidenciada por una pérdida de masa continua por encima de los 275, 250 y 225 °C, respectivamente. También pudieron observarse en las curvas de DTG desplazamientos de las endotermas de deshidratación de las CD. Estos eventos pueden ser explicados mediante interacciones moleculares débiles entre el fármaco y la CD a altas temperaturas, pero no fueron evidencias de la formación de verdaderos complejos de inclusión. Paralelamente, el pico de fusión de SMR se encuentra ausente en las curvas de DSC de las muestras liofilizadas, así como también estos diagramas presentan desplazamientos en las temperaturas de deshidratación de las correspondientes CD y cambios en los valores de pérdida de peso. Las curvas de los SBL de SMR: β -CD y SMR:M- β -CD (Figura 2.13) también presentan eventos térmicos a 211,92 °C/232,35 °C y 212,73 °C, respectivamente, ausentes en la curva de SMR. A partir de esto, sugerimos que estos eventos podrían estar relacionados a la fusión de la droga libre o al comienzo de la descomposición, ya que el primer pico en DSC de cada uno coincide con el comienzo en la pérdida de masa en la curva de TGA. En los SBL de INM con CD (Figuras 2.15 y 2.16) el pico de fusión del IFA puro se encuentra ausente en las curvas de DSC y se observan desplazamientos en las temperaturas de deshidratación máxima de β -CD e HP- β -CD. Sin embargo, se observó una disminución en las temperaturas de descomposición de los SBL con β -CD y M- β -CD respecto a las MFB, con perfiles de TGA similares al de INM pura. Las diferencias entre los perfiles de las MFB y los SBL podrían sugerir la formación de

verdaderos complejos de inclusión de SMR e INM con las CD cuando son preparados mediante la técnica de liofilización. Por otro lado, al igual que SMR, la curva de DSC de MEG [Figura 2.16 b)] presenta un pico endotérmico agudo sin pérdida de peso correspondiente a su punto de fusión, a la vez que se descompone por encima de los 200 °C. En la curva de la MFB de SMR:MEG, el pico endotérmico correspondiente al punto de fusión de MEG se encuentra ensanchado y desplazado hacia menores temperaturas, lo que podría indicar la interacción entre los componentes. Además, esta señal no está presente en el SBL y la descomposición ocurre a mayores temperaturas y con menor pérdida de peso, probablemente demostrando la formación de una nueva entidad con mayor estabilidad térmica. También, existen tres eventos en la curva de DSC del SBL a 113,55; 155,4 y 213,37 °C que podrían corresponder a la fusión de MEG y SMR libres remanentes, así como al comienzo de la descomposición, respectivamente. El grado de cristalinidad relativo de MEG (MEG_{GCR}) en la MFB y en el SBL fue estimada mediante la relación entre la entalpía de fusión de MEG calculada en la muestra ($\Delta H_{muestra}$) y la de MEG pura (ΔH_{MEG}), de acuerdo a la siguiente ecuación:⁶²

$$MEG_{GCR} = \Delta H_{muestra} / \Delta H_{MEG}$$

donde $\Delta H_{muestra}$ es la entalpía de fusión de MEG calculada en la mezcla física o en el complejo y ΔH_{MEG} es la entalpía de fusión de MEG pura. Los valores reportados en la Tabla 2.6 muestran que el SBL presentó menor grado de cristalinidad que la MFB, lo que indicaría que ocurre la formación de un sistema binario entre SMR y MEG.

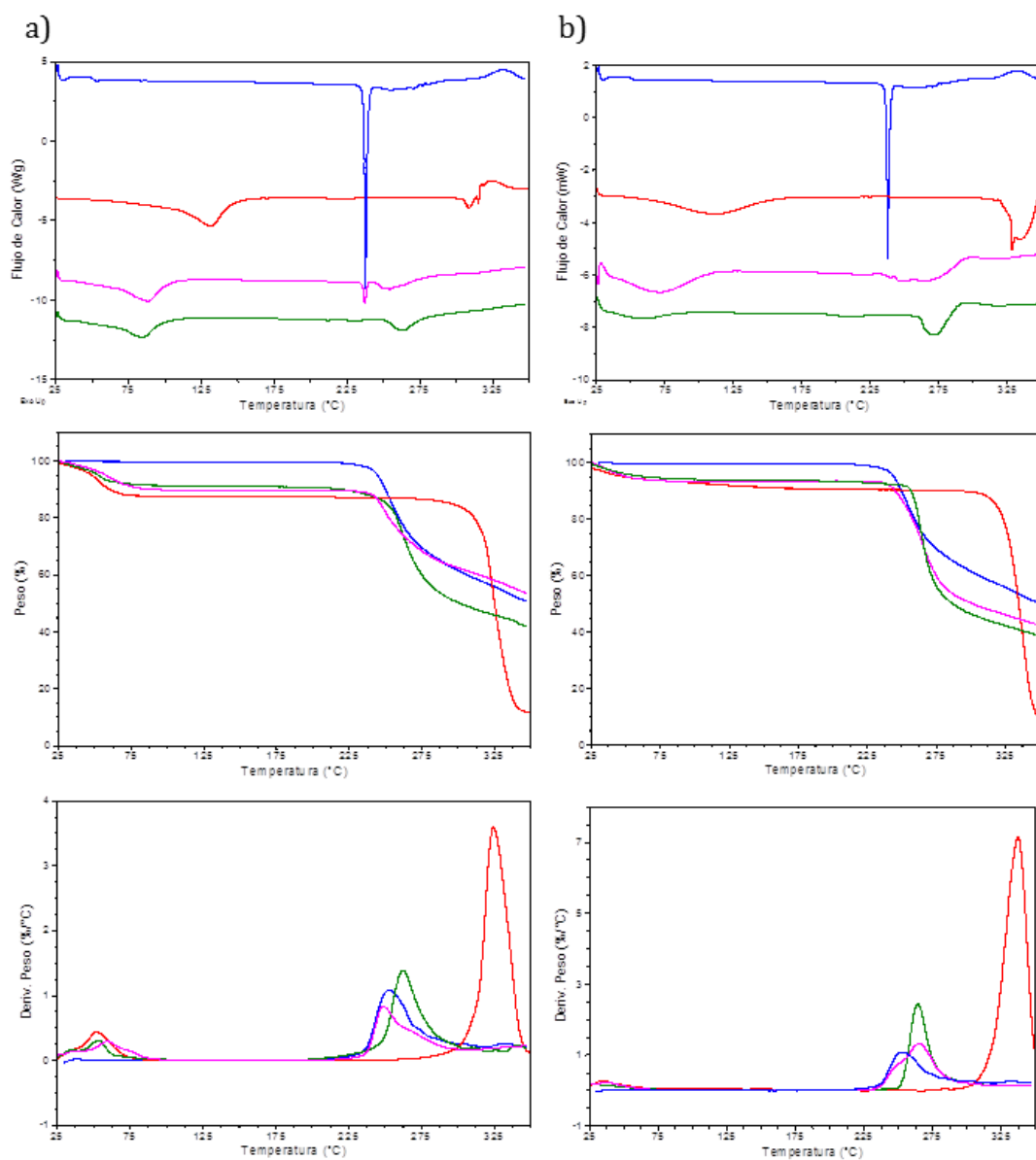


Figura 2.13. Curvas de DSC, TGA y DTG de los complejos binarios de SMR con a) β -CD y b) M- β -CD, siendo: SMR pura (—); CD pura (—); MFB (—) y SBL (—).

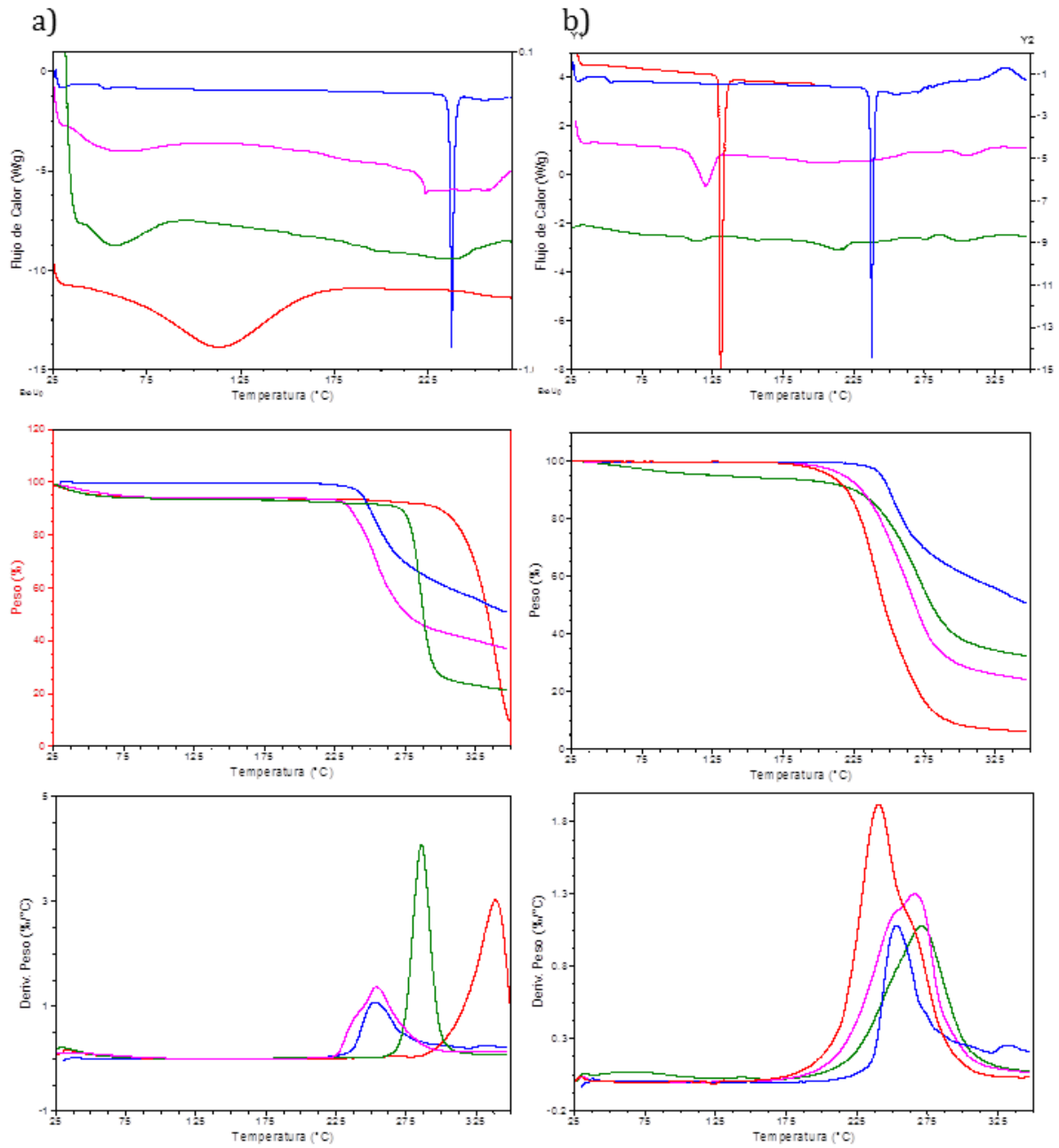


Figura 2.14. Curvas de DSC, TGA y DTG de los complejos de SMR con a) HP-β-CD y b) MEG, siendo: SMR pura (—); CD pura (—); MFB (—) y SBL (—).

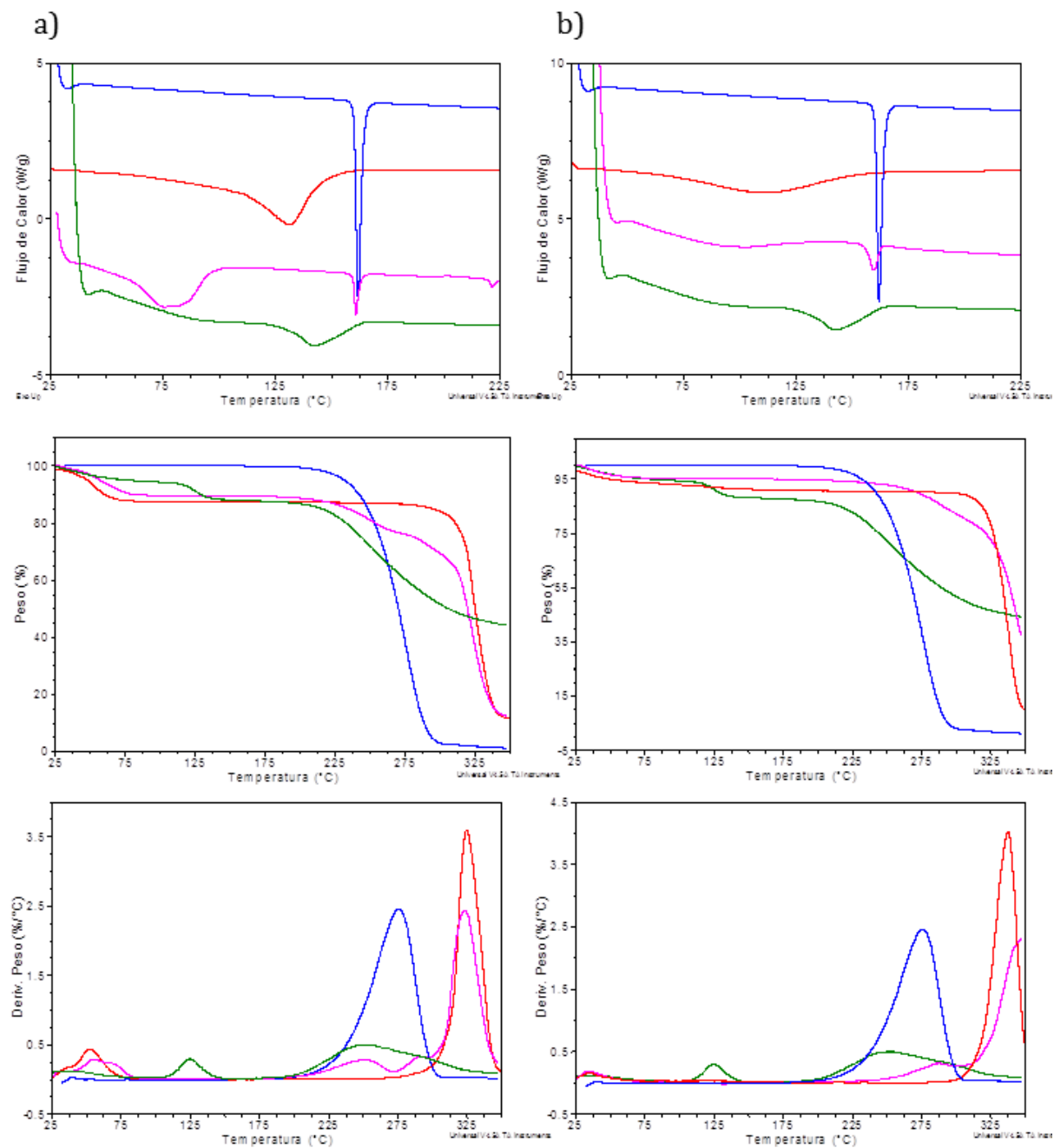


Figura 2.15. Curvas de DSC, TGA y DTG de los complejos de INM con a) β -CD y b) M- β -CD, siendo: INM pura (—); CD pura (—); MFB (—) y SBL(—).

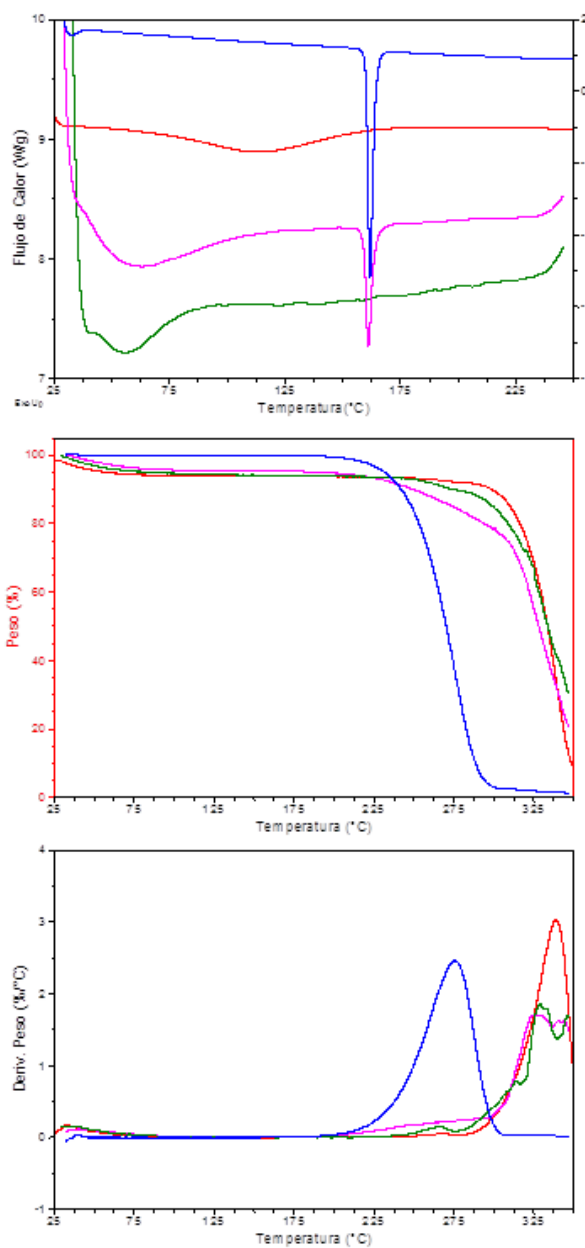


Figura 2.16. Curvas de DSC, TGA y DTG de los complejos de INM con c) HP- β -CD, siendo: INM pura (—); CD pura (—); MFB (—) y SBL (—).

Tabla 2.5. Datos extraídos de las curvas de DSC, TGA y DTG para los componentes puros, mezclas físicas y complejos liofilizados de: **a)** SMR e INM con CD, y de **b)** SMR con MEG

a)		Evento de deshidratación			Fusión	Evento de descomposición		
		DSC (°C)	TGA (PP 25-100 °C)	DTG (°C)	DSC (°C)	DSC (°C)	TGA (PP 200-350 °C)	DTG (°C)
	SMR	/	0,28%	37,2	237,51	>270	48,87%	252,81
SMR:β-CD	β-CD	131,41	12,49%	52,42	/	>290	77,63%	324,47
	MFB	88,7	9,98%	59,51	237,16	>235	35,95%	248,8
	SBL	85,25	8,21%	53,12	/	>240	48,73%	262,34
SMR:M-β-CD	M-β-CD	112,2	5,08%	35,85	/	>300	90,43%	337,25
	MFB	69,94	6,42%	38,17	239,86	>240	50,69%	265,03
	SBL	56,87	6,14%	28,22	/	>250	54,17%	264,25
SMR:HP-β-CD	HP-β-CD	119,57	4,47%	32,93	/	>300	88,29%	338,61
	MFB	58,74	5,31%	36,38	223,66	>225	56,75%	253,75
	SBL	47,98	6,18%	29,26	/	>260	71,31%	285,84
	INM	/	0,19%	38,96	161,77	>250	98,24%	275,55
INM:β-CD	β-CD	131,41	12,49%	52,42	/	>290	77,63%	324,47
	MFB	75,24	10,39%	55,66	160,78	>275	78,76%	323,19
	SBL	155,4	8,40%	140,61	/	>200	43,16%	242,8
INM:M-β-CD	M-β-CD	112,2	5,08%	35,85	/	>300	90,43%	337,25
	MFB	44,5	5,09%	34,59	159,52	>250	55,03%	350
	SBL	143,04	6,42%	124,8	/	>200	42,58%	253,19
INM:HP-β-CD	HP-β-CD	119,57	4,47%	32,93	/	>250	88,29%	338,61
	MFB	59,7	4,08%	40,95	161,06	>225	73,74%	325,43
	SBL	55,51	5,27%	37,04	/	>250	62,60%	225,26 329,31

b)		Deshidratación		Fusión		Descomposición		
		PP 25-100 °C	DTG (°C)	MEG (°C)	SMR(°C)	Descomp. (°C)	PP 200-350 °C	DTG (°C)
	SMR	0,28%	37,2	φ	237,51	>270	48,87%	252,81
SMR:MEG	MEG	0,41%	28,42	130,73	/	>200	93,67%	265,72
	MFB	0,37%	30,39	120,1	/	>220	75,47%	265,72
	SBL	/	/	/	/	>225	61,87%	270,76

PP: pérdida de peso; /: no aplicable;

Tabla 2.6. Grado de cristalinidad relativo de MEG (MEG_{GCR}) en la MFB y en el SBL con SMR.

ΔH_{MEG} (J/g)	$\Delta H_{SMR:MEG MFB}$ (J/g)	$\Delta H_{SMR:MEG SBL}$ (J/g)	MEG _{GCR} en MFB	MEG _{GCR} en SBL
264,7	98,78	14,05	0,37	0,05

2.3.1.2.3. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

La Difracción de Rayos X de polvos es una metodología apropiada para la determinación del estado molecular de un complejo.⁶³ Las Figuras 2.17 y 2.18 muestran los patrones de difracción de Rayos X de SMR e INM y de las MFB de los correspondientes componentes liofilizados o de los SBL con CD y MEG, respectivamente.

En el difractograma de Rayos X de SMR pura (Figura 2.17 a), existen picos agudos a 2θ = 24,2°; 24,7°; 27,4°; 28,9°; 29,9°; 30,8°; 32,4°; 36,7°; 38,0°; 44,9°; 45,5° que sugieren que el fármaco se presenta como un material cristalino, del mismo modo que INM (Figura 2.18 a) con picos a 2θ = 21,9°; 23,5°; 24,2°; 26,7°; 29,4° y MEG, cuyo patrón de difracción presentó picos agudos a 2θ = 17,1°; 18,1°; 19,7°; 21,6°; 21,9°; 26,2°; 29,5°; 32,9°; 34,5°; 35,3°; 38,0°; 41,5°; 42,4°. β -CD también exhibió un patrón de difracción típico de una sustancia cristalina (a 2θ = 22,9°; 27,1°; 34,9°); pero M- β -CD e HP- β -CD exhibieron carácter amorfo (Figuras 2.17 b, e y h, respectivamente).

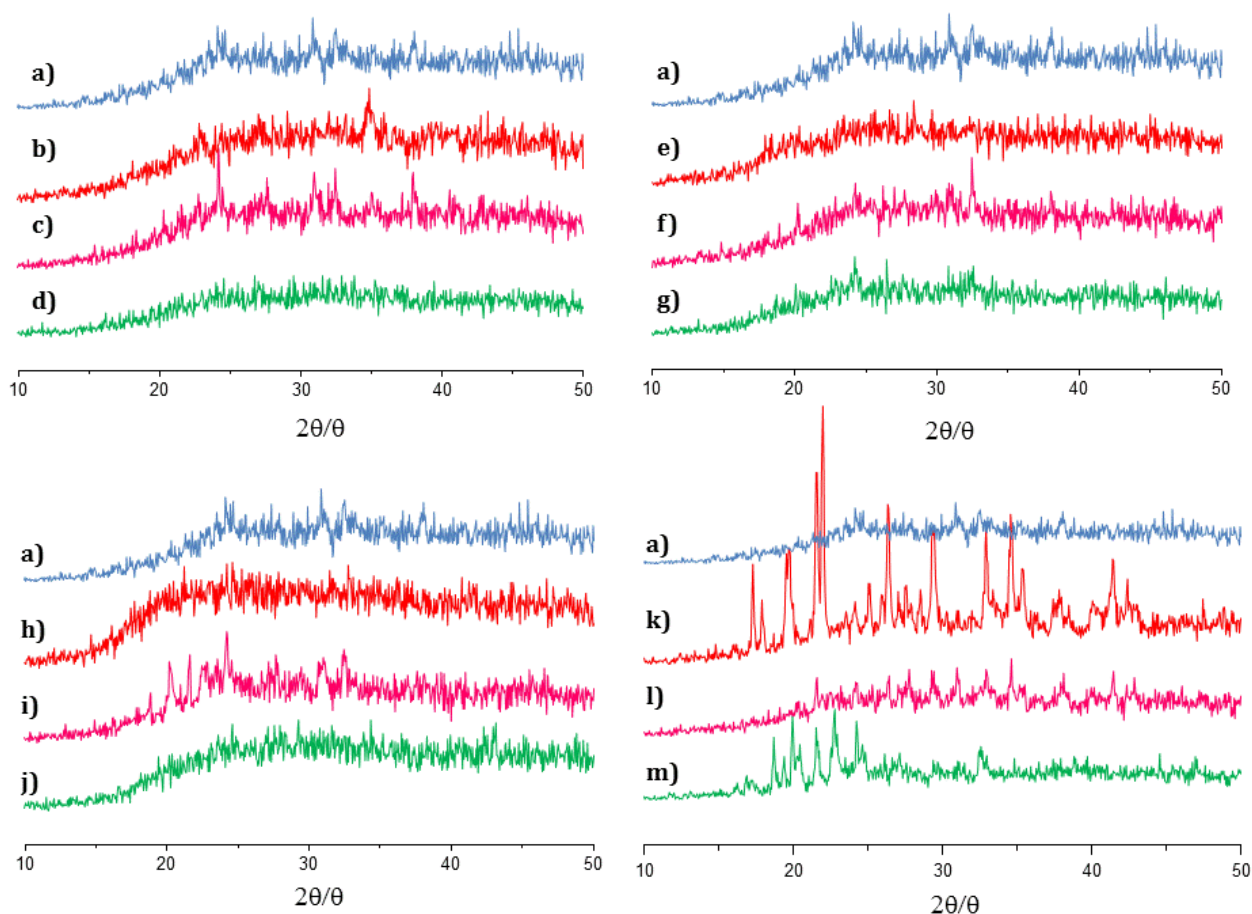


Figura 2.17. Difractogramas de Rayos X de: a) pura SMR; b) β -CD pura; c) MFB SMR: β -CD 1:1; d) SBL SMR: β -CD 1:1; e) M- β -CD pura; f) MFB SMR:M- β -CD 1:1; g) SBL SMR:M- β -CD 1:1; h) HP- β -CD pura; i) MFB SMR:HP- β -CD 1:1; j) SBL SMR:HP- β -CD 1:1; k) MEG puro; l) MFB SMR:MEG 1:1; m) SBL SMR:MEG 1:1.

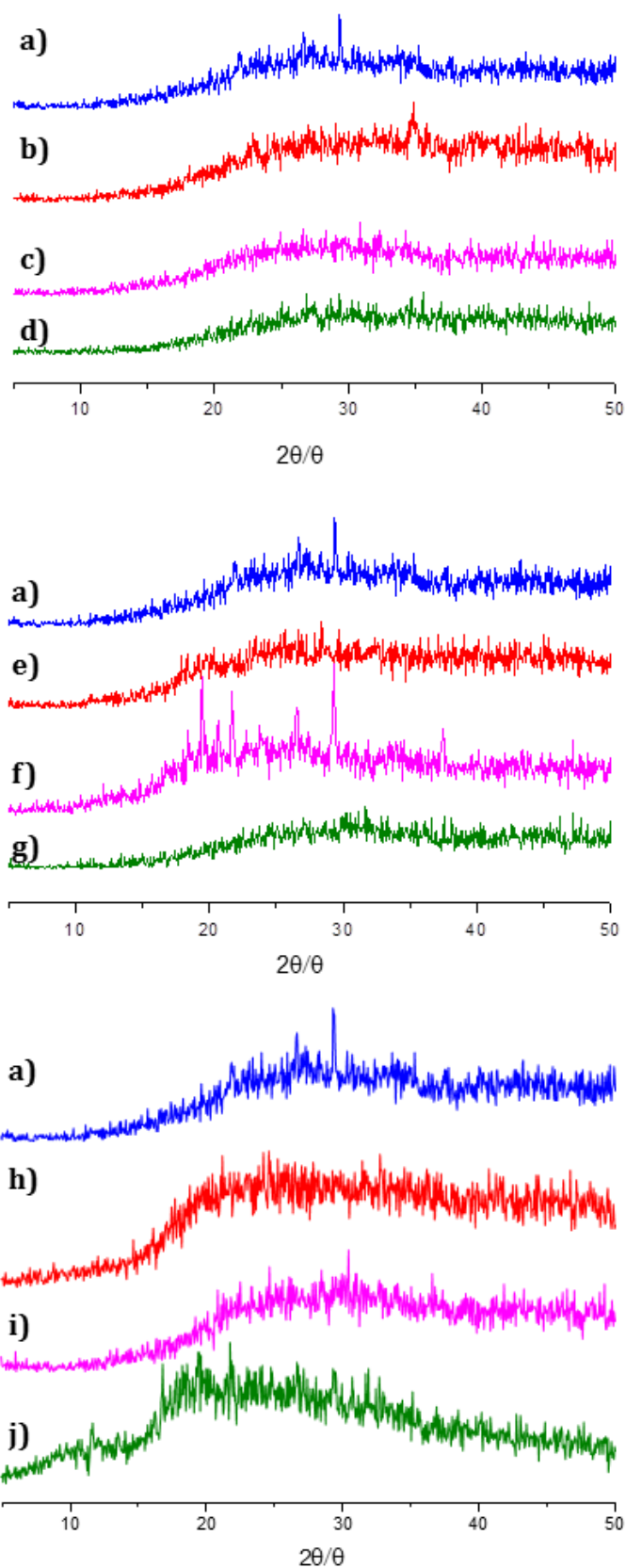


Figura 2.18. Difractogramas de Rayos X de: a) pura INM; b) β -CD pura; c) MFB SMR: β -CD 1: 1; d) SBL SMR: β -CD 1:1; e) M- β -CD pura; f) MFB SMR:M- β -CD 1:1; g) SBL SMR:M- β -CD 1:1; h) HP- β -CD pura; i) MFB SMR:HP- β -CD 1:1; j) SBL SMR:HP- β -CD 1:1.

Con el objetivo de evaluar el efecto del proceso de liofilización en la cristalinidad de los componentes, fueron adquiridos los patrones de difracción de las sustancias cristalinas puras liofilizadas (SMR, INM, β -CD y MEG). Los patrones de DRX de las MFB confirmaron la presencia de las especies sólidas aisladas, debido a que los patrones de difracción presentan picos correspondientes a SMR, INM, β -CD o MEG o las bandas amorfas de M- β -CD o HP- β -CD, respectivamente. Por el contrario, en los SBL se observó un patrón totalmente amorfo de la droga, caracterizado por patrones de difracción que presentaron únicamente bandas amplias donde no es posible distinguir los picos característicos del fármaco. Estos resultados sugieren que SMR e INM ya no están presentes como un material cristalino y que los complejos sólidos con CD existen en estado amorfo. Por otro lado, algunos picos de difracción permanecieron en el SBL de SMR:MEG atribuibles a cristales de MEG, lo que puede corresponder a la presencia de un exceso de MEG aislado. No hubo ninguna coincidencia con el patrón de DRX de SMR y se visualizaron picos a diferentes ángulos de difracción, sugiriendo la formación de una nueva entidad con diferente orden de cristalinidad a la de los componentes aislados.

2.3.2. COMPLEJOS TERNARIOS

2.3.2.1. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN

2.3.2.1.1. ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FASES (ASF)

Con el objetivo de evaluar la formación de complejos ternarios entre SMR, MEG y las tres CD (β -CD, M- β -CD o HP- β -CD) y analizar el efecto sobre la solubilidad acuosa del principio activo, los análisis de solubilidad de fases en agua y en soluciones acuosas de pH 2,0 y pH 8,0 con cada ciclodextrina, fueron realizados tras la adición de una concentración fija de MEG de 3 mM, como componente ternario, los que son presentados en la Figura 2.19. Los sistemas ternarios de INM no fueron tenidos en consideración para su estudio debido a que ensayos preliminares demostraron que MEG posee un efecto negativo sobre la estabilidad de este IFA, incluso en presencia de las CD.

Tabla 2.7. Solubilidades de SMR, constantes de formación aparentes de complejos binarios (K_{CB}) y ternarios (K_{CT}) e incrementos de solubilidad respecto a la solubilidad intrínseca de SMR (S_{max}/S_0) o respecto a la solubilidad de SMR tras la adición de MEG 3 mM (S_{MEG}).

	Isoterma	S_{max} (mg/mL)	S_{max}/S_0	S_{max}/S_{MEG}	K_{CT} (M^{-1})	K_{CB} (M^{-1})	pH	
SMR:β-CD: MEG	agua	A_p	$0,97 \pm 0,05$	4 ± 1	$2,5 \pm 0,3$	35 ± 14	215 ± 42	7,43
	pH 2,0	A_N	$1,30 \pm 0,08$	4 ± 1	$2,4 \pm 0,3$	200 ± 18	207 ± 45	1,72
	pH 8,0	A_L	$2,36 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,2$	$1,15 \pm 0,09$	15 ± 4	31 ± 8	8,03
SMR:M-β-CD: MEG	agua	A_L	$6,28 \pm 0,06$	29 ± 2	$3,5 \pm 0,3$	29 ± 3	73 ± 21	7,85
	pH 2,0	A_L	$2,8 \pm 0,5$	9 ± 1	$3,6 \pm 0,6$	42 ± 2	118 ± 29	1,81
	pH 8,0	A_N	11 ± 1	7 ± 1	$5,0 \pm 0,8$	88 ± 9	59 ± 13	7,95
SMR:HP-β-CD: MEG	agua	A_L	$4,4 \pm 0,4$	20 ± 5	$1,6 \pm 0,3$	76 ± 9	144 ± 26	7,92
	pH 2,0	A_L	$1,23 \pm 0,01$	$3,9 \pm 0,7$	$1,70 \pm 0,09$	58 ± 4	65 ± 17	1,85
	pH 8,0	A_L	$2,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,1$	7 ± 3	20 ± 4	8,00

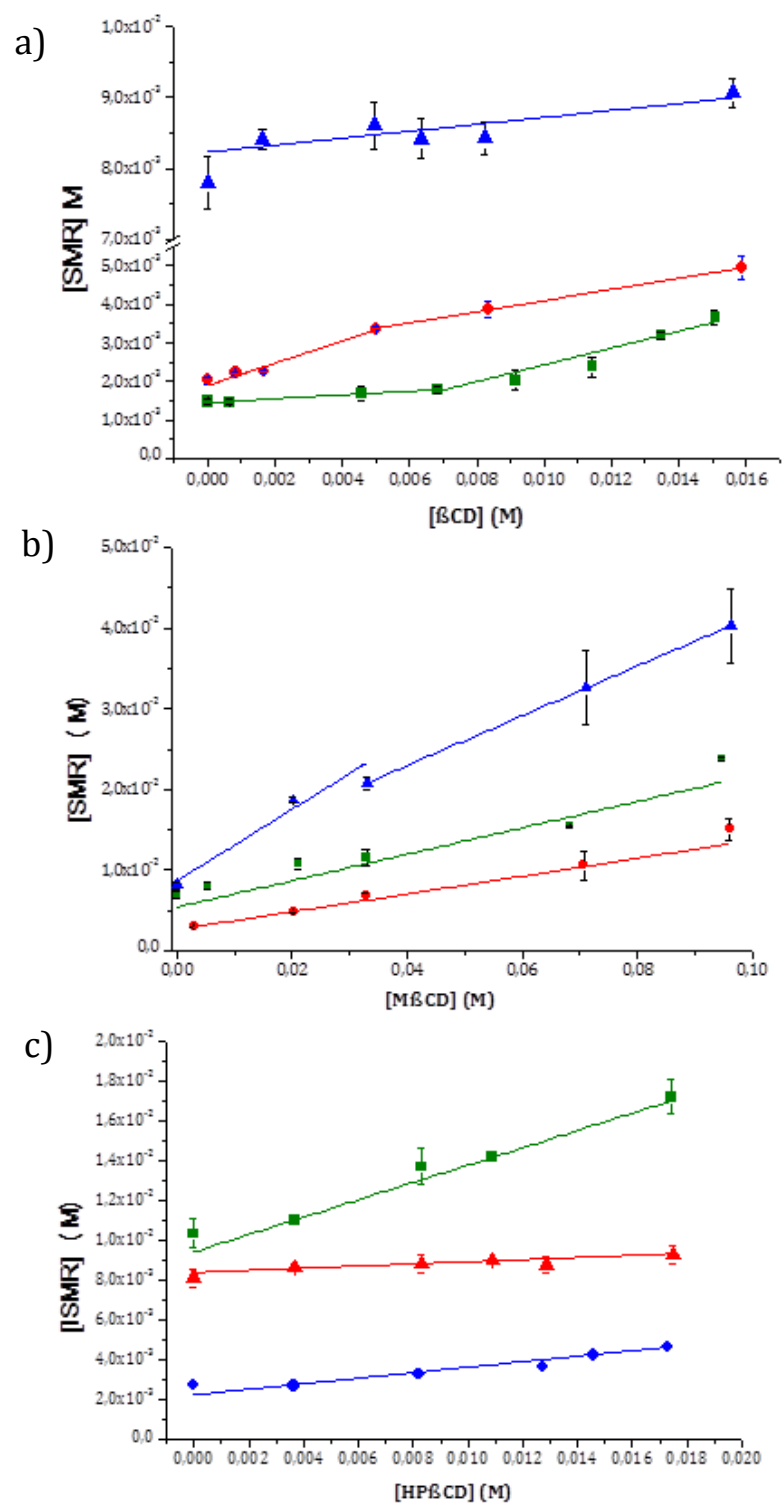


Figura 2.19. Diagramas de Solubilidad de Fases de SMR con: a) β -CD; b) M- β -CD; c) HP- β -CD, en presencia de MEG 3 mM, en agua (■), a pH 2 (●) y a pH 8 (▲) a 25 °C.

En general, la mayoría de las isotermas pueden ser clasificadas como de tipo A_L de acuerdo a Higuchi y Connors,²⁹ observándose un aumento lineal en la solubilidad de SMR en función de la concentración de CD y que se formaron complejos solubles sin existencia de precipitado en el rango de concentración de CD utilizada. Estos resultados se condicen con los datos reportados previamente para los complejos binarios de SMR:CD y SMR:MEG en la Sección 2.3.1. Excepcionalmente, las isotermas de SMR: β -CD:MEG y SMR:M- β -CD:MEG a pH 2,0 y 8,0, respectivamente, fueron clasificadas como tipo A_N , que en general sugiere la auto-agregación de las CD o la alteración de la naturaleza efectiva del solvente en presencia de grandes concentraciones de ligando, afectando el grado de complejación aparente.^{29,30}

Por otro lado, el diagrama de SMR: β -CD:MEG en agua fue tipo A_p , sugiriendo un incremento en la relación estequiométrica huésped-receptor a concentraciones altas de β -CD. Considerando los resultados previamente reportados para los correspondientes complejos binarios, cuyas isotermas de solubilidad fueron de tipo A_L con las tres CD, podría establecerse que, en ciertos casos, la incorporación de MEG modifica la complejación del fármaco con la CD. Los valores de las pendientes de todos los diagramas menores a 1, sugieren la formación de complejos SMR-CD de estequiometría 1:1 en solución. Además, las constantes de estabilidad aparentes (K_c) fueron calculadas utilizando la ecuación de Higuchi y Connors.

Las solubilidades máximas alcanzadas (S_{max}), los incrementos de solubilidad y las constantes de estabilidad (K_c) para todos los sistemas son presentados en la Tabla 2.7. A partir de estos valores, pueden deducirse diferentes interacciones entre el fármaco y las tres CD, en presencia de MEG. La mayor constante de estabilidad para el complejo SMR: β -CD:MEG fue obtenida a pH 2,0, cuyo valor no presentó diferencia significativa con el del sistema binario SMR: β -CD, indicando que la interacción con β -CD fue producida de manera más eficaz cuando el grupo ácido sulfonamida del fármaco existe en su forma no ionizada y sugiriendo que MEG no afecta la incorporación del IFA dentro de la cavidad. Los valores de las constantes de estabilidad de los sistemas ternarios (K_{CT}) fueron menores a los de los correspondiente sistemas binarios (K_{CB}), excepto para el complejo ternario con M- β -CD a pH 8,0, cuyo K_{CT} fue mayor que su K_{CB} . En adición, es importante recordar que en la Sección 2.3.1.1.1 se expuso que la solubilidad de SMR disminuye, a pH 2,0, con concentraciones crecientes de MEG, lo que puede atribuirse a la repulsión electrostática de MEG y SMR, ya que ambos presentan sus grupos aminos protonados a este valor de pH. Sin embargo, este comportamiento no fue observado para los sistemas ternarios a pH 2,0 con las concentraciones de MEG utilizadas en estos estudios. Analizando los valores de S_{max} obtenidos para cada sistema, podría concluirse que, aunque en todos ellos fue observado un incremento, para los sistemas ternarios con M- β -CD e HP- β -CD en agua, los aumentos en los valores de S_{max} fueron mayores, con incrementos de 29 y 20 veces, respectivamente, en relación con la solubilidad en ausencia de ligandos.

De acuerdo a estos resultados, podemos concluir que ocurrió un incremento en la solubilidad debido a la co-presencia de CD y MEG, ya que los valores de $S_{m\acute{a}x}$ obtenidos con los sistemas ternarios fueron superiores a los obtenidos con los complejos binarios. El comportamiento de las tres CD sugiere que sus estructuras químicas influyen en el diferente modo de interacción con SMR en presencia de MEG.

2.3.2.1.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN-¹H).

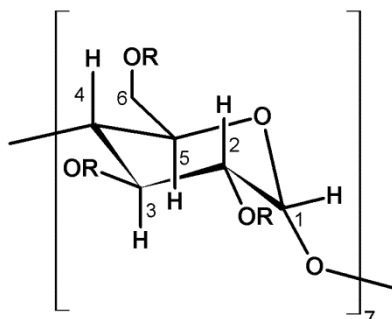
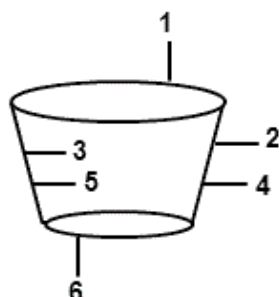
Con el objetivo de estudiar los modos de interacción entre SMR, MEG y cada una de las tres CD en los complejos ternarios, se compararon los corrimientos químicos de los protones de los componentes puros, de los complejos binarios y ternarios. Debido a que los espectros RMN-¹H de CD y MEG presentaron interferencias entre ellos, lo que fue también reflejado en ROESY, fueron llevados a cabo experimentos de doble resonancia (2D NMR), [Heteronuclear single quantum coherence (HSQC) and Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC)], para elucidar las señales con mayor resolución. Los corrimientos químicos fueron extraídos de los espectros HSQC (Figura 2.20) y son enlistados en las Tabla 2.8 y 2.9.

En los complejos ternarios, todos los protones de SMR presentaron desplazamientos hacia campos altos en comparación con el fármaco puro y los correspondientes complejos binarios con cada CD, sugiriendo un fenómeno de apantallamiento predominante del grupo amino de MEG en las proximidades del grupo sulfonamida de SMR, también observado previamente en el sistema binario SMR:MEG.³⁸ Por el contrario, todos los protones de SMR presentaron desplazamientos hacia campos bajos en comparación con el sistema binario SMR:MEG, probablemente debido a interacciones de tipo Van Der Waals entre SMR y la cavidad interna de CD, como se observó también para los complejos binarios.³⁸

Los protones de CD presentaron desplazamientos hacia campos bajos en comparación con los correspondientes ligandos puros, observándose los corrimientos más significativos en los protones H₅ y H₃ para los complejos ternarios con M-β-CD e HP-β-CD, respectivamente. Los protones de β-CD presentaron desplazamientos hacia campos altos en el sistema SMR:β-CD:MEG con respecto al complejo binario SMR:β-CD, probablemente debido al efecto de apantallamiento del grupo amino de MEG, lo que podría indicar la interacción de β-CD con MEG libre. Por otro lado, los protones de M-β-CD e HP-β-CD presentaron desplazamientos a campos bajos en comparación con los sistemas binarios, sugiriendo la interacción del par SMR:MEG con la cavidad interna hidrofóbica de CD mediante fuerzas de tipo Van Der Waals. Estos hallazgos podrían explicar los apreciables incrementos en la solubilidad observados en los estudios de solubilidad de fases realizados en agua, cuando SMR es combinada con M-β-CD o HP-β-CD en presencia de MEG, indicando la formación de verdaderos complejos ternarios.

Tabla 2.8. Desplazamientos químicos de cada CD pura (δ_{CD}), en el complejo binarios (δ_B) y ternario (δ_T).

CD

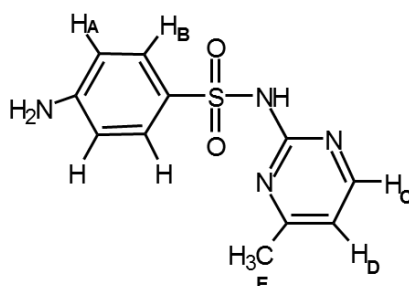


SMR:βCD:MEG					
	$\delta_{\beta CD}$	δ_B	δ_T	$\delta_T - \delta_{\beta CD}$	$\delta_T - \delta_B$
H ₁	5,0678	5,1184	5,0976	0,0298	-0,0208
H ₂	3,6470	3,4301	3,6758	0,0288	0,2457
H ₃	3,9654	3,9952	3,9872	0,0218	-0,0080
H ₄	3,5835	3,6322	3,611	0,0272	-0,0215
H ₅	3,8505	3,8709	3,8800	0,0295	0,0091
H ₆	3,8774	3,9216	3,9024	0,250	-0,0192
SMR:MβCD:MEG					
	$\delta_{M\beta CD}$	δ_B	δ_T	$\delta_T - \delta_{M\beta CD}$	$\delta_T - \delta_B$
H ₁	5,2507	5,2447	5,2808	0,0301	0,0361
H _{1a}	5,0638	5,0581	5,0981	0,0343	0,0400
H ₂	Superposición con H ₄			/	/
H _{2a}	3,3993	3,3993	3,4222	0,0229	0,0229
H ₃	4,0081	3,9952	4,0231	0,0150	0,0279
H _{3a}	3,9541	3,9541	3,9683	0,0142	0,0142
H ₄	Superposición con H ₂			/	/
H ₅	3,6698	3,7985	3,7990	0,1292	0,0005
H ₆	3,8624	3,8877	3,8973	0,0349	0,0096
OCH ₃	3,5518	3,5788	3,6024	0,0506	0,0236
SMR:HPβCD:MEG					
	$\delta_{HP\beta CD}$	δ_B	δ_T	$\delta_T - \delta_{HP\beta CD}$	$\delta_T - \delta_B$
H ₁	5,2517	5,2372	5,2565	0,0048	0,0193
H _{1a}	5,0978	5,0886	5,1054	0,0076	0,0168
H ₂	3,6489	3,6302	3,6900	0,0411	0,0598
H ₃	3,9839	4,0458	4,8735	0,8896	0,8278
H ₄	3,5214	3,5256	3,5348	0,0134	0,0092
H ₅	3,7454	3,8476	*	/	/
H ₆	3,8947	3,8932	3,9009	0,0062	0,0077

a: posición metilada; *: indistinguible; /: no corresponde asignación,

Tabla 2.9. Corrimientos químicos de Sulfamerazina libre (δ_S), en el complejo binario con MEG ($\delta_{S:M}$) o con la correspondiente CD (δ_B) y en el complejo ternario (δ_T).

SMR



			SMR: β -CD:MEG				
	δ_S	$\delta_{S:M}$	δ_B	δ_T	$\delta_T - \delta_S$	$\delta_T - \delta_B$	$\delta_T - \delta_M$
H_A	8,1764	8,0290	8,3176	8,0858	-0,0906	-0,2318	0,0568
H_B	7,7369	7,6342	7,7968	7,6916	-0,0453	-0,1052	0,0574
H_C	6,8670	6,7889	6,9471	6,8119	-0,0551	-0,1352	0,0230
H_D	6,8091	6,6471	6,8322	6,6844	-0,1247	-0,1478	0,0373
H_E	2,3901	2,2701	2,4765	2,3214	-0,0687	-0,1551	0,0513
			SMR:M- β -CD:MEG				
	δ_S	$\delta_{S:M}$	δ_B	δ_T	$\delta_T - \delta_S$	$\delta_T - \delta_B$	$\delta_T - \delta_M$
H_A	8,1764	8,0290	8,3406	8,1989	0,0225	-0,1417	0,1699
H_B	7,7369	7,6342	7,7530	7,7306	-0,0063	-0,0224	0,0964
H_C	6,8670	6,7889	6,9449	6,7982	-0,0688	-0,1467	0,0093
H_D	6,8091	6,6471	6,6426	6,7543	-0,0548	0,1117	0,1072
H_E	2,3901	2,2701	2,4522	2,3873	-0,0028	-0,0649	0,1172
			SMR:HP- β -CD:MEG				
	δ_S	$\delta_{S:M}$	δ_B	δ_T	$\delta_T - \delta_S$	$\delta_T - \delta_B$	$\delta_T - \delta_M$
H_A	8,1764	8,0290	8,2656	8,1574	-0,0190	-0,1082	0,1284
H_B	7,7369	7,6342	7,7543	7,7247	-0,0122	-0,0296	0,0905
H_C	6,8670	6,7889	6,8932	6,8404	-0,0266	-0,0528	0,0515
H_D	6,8091	6,6471	6,8034	6,7758	-0,0333	-0,0276	0,1287
H_E	2,3901	2,2701	2,4323	2,3704	-0,0197	-0,0619	0,1003

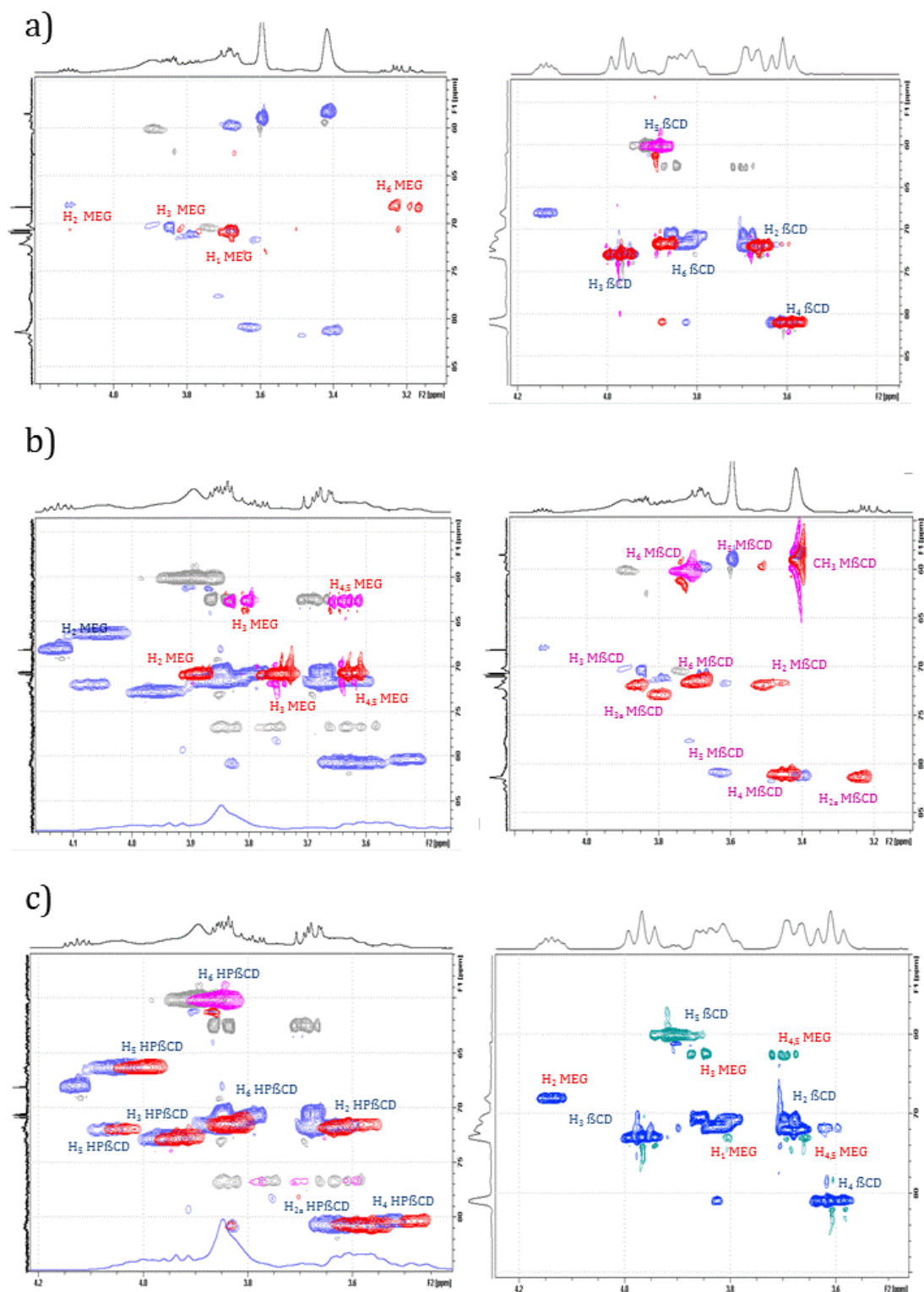


Figura 2.20. Contornos parciales de los espectros RMN HSQC 2D de los complejos: a) SMR:β-CD:MEG; b) SMR:M-β-CD:MEG y c) SMR:HP-β-CD:MEG, superpuestos con los correspondientes complejos binarios con CD y MEG (a la izquierda y a la derecha, respectivamente)

2.3.2.2. ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO

Del mismo modo que con los complejos binarios, los sistemas sólidos ternarios fueron preparados por el método de liofilización (STL), así como mediante simple amasado fueron obtenidas las mezclas físicas de los componentes ternarios liofilizados (MFT), los cuales fueron caracterizados mediante DSC, TGA, IR y DRX.

2.3.2.2.1. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC), ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTICO (TGA) Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO DIFERENCIAL (DTG).

En la Sección 2.3.1, se describió detalladamente la formación de verdaderos complejos de inclusión de SMR con β -CD, M- β -CD e HP- β -CD y de un sistema binario con MEG, mediante DSC y TG. La isoterma de SMR fue típica de una sustancia cristalina y se caracterizó por un pico endotérmico agudo (a 237,51 °C), asignado a su punto de fusión, descomponiéndose por encima de los 270 °C. Las CD presentaron deshidratación en un rango de temperaturas de 25 a 150 °C y descomposición por encima de los 250 °C. Por otro lado, la curva de DSC de MEG presentó una endoterma aguda, sin pérdida de peso, correspondiente a su punto de fusión, descomponiéndose por encima de los 200 °C. En la presente Sección, el comportamiento térmico de los complejos ternarios de SMR:MEG:CD fue monitoreado utilizando el mismo procedimiento, mediante la comparación de los patrones obtenidos de las sustancias puras, las MFT, SBL y STL, los cuales se presentan en la Figura 2.21.

En las curvas de las MFT de β -CD, M- β -CD e HP- β -CD los picos endotérmicos correspondientes a los puntos de fusión de SMR y MEG desaparecieron o se presentaron pequeños desplazamientos hacia menores temperaturas (125,24, 128,64 y 125,75 °C), respectivamente. En adición, los eventos de deshidratación de β -CD, M- β -CD e HP- β -CD se desplazaron hacia menores temperaturas (85,39, 63,09 y 63,09 °C) en comparación con los correspondientes ligandos puros. Estos eventos podrían indicar la ocurrencia de una interacción molecular débil entre los componentes a altas temperaturas, pero no fueron evidencias de la formación de verdaderos complejos de inclusión. Por el contrario, en las curvas de DSC del STL las endotermas de fusión de SMR y MEG no se observaron. También, el evento de deshidratación de HP- β -CD en el STL desplazó hacia menores temperaturas (56,05 °C) respecto a la correspondiente MFT (63,09 °C). Además, la descomposición del STL con β -CD y M- β -CD ocurrió a mayores temperaturas (262,34 y 264,25 °C) y la MFT (281,84 y 288,85 °C), probablemente demostrando la formación de una nueva entidad con mayor estabilidad térmica. Estos resultados sugieren que una interacción diferente ocurre entre SMR y CD en presencia de MEG, cuando los sistemas ternarios son preparados mediante la técnica de liofilización, a la vez que sustentan los hallazgos anteriores de los estudios de RMN, que indicaron la formación de verdaderos complejos de inclusión cuando son utilizadas HP- β -CD y M- β -CD.

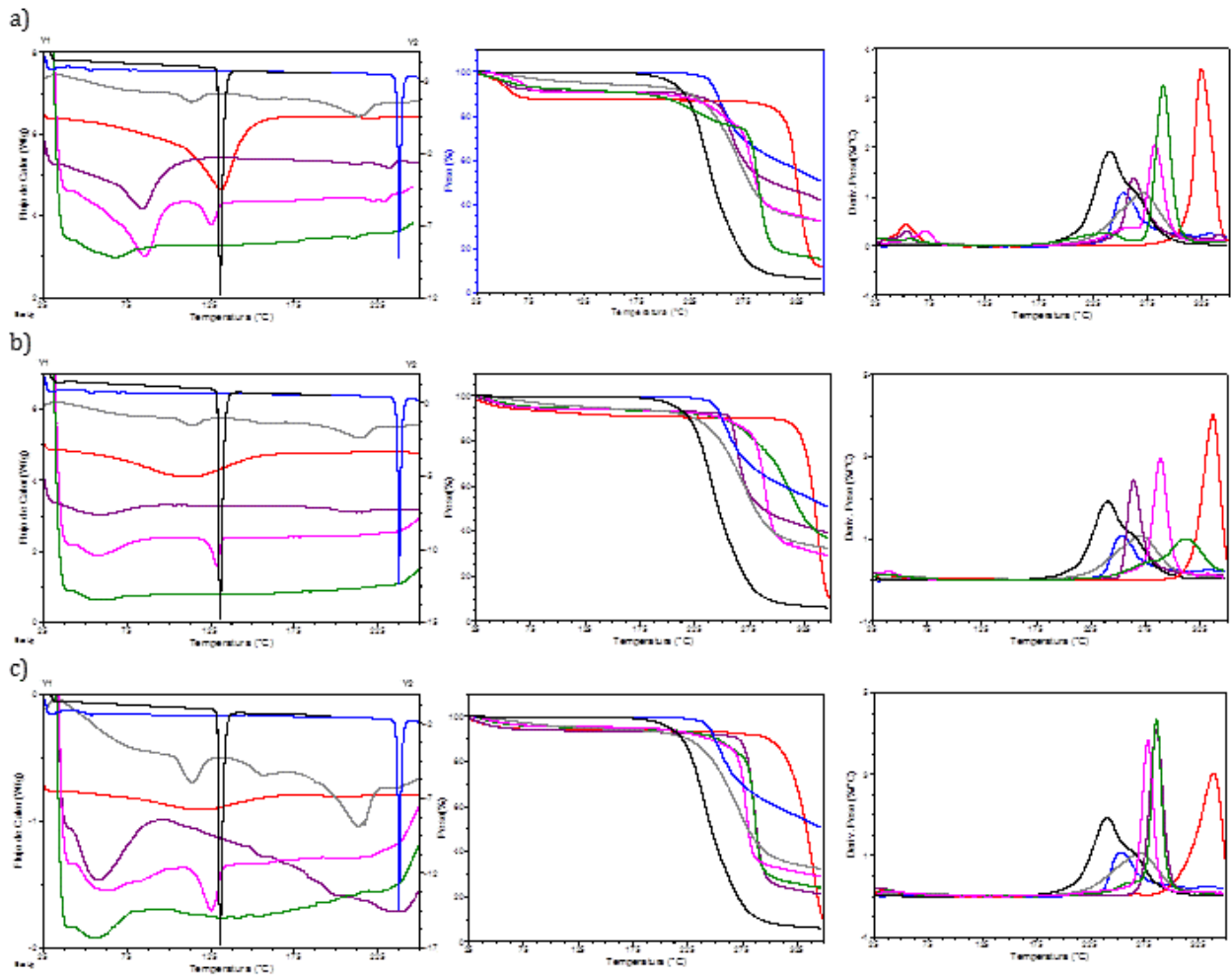


Figura 2.21. Curvas de DSC, TGA y DTG de los complejos: a) SMR: β -CD:MEG; b) SMR:M- β -CD:MEG y c) SMR:HP- β -CD:MEG, siendo: SMR pura (—); MEG puro (—); SBL con MEG (—); CD pura (—); SBL con CD (—); MFT (—); STL (—). Escalas: Y1: para SMR y MEG; Y2: para el resto de las curvas;

Tabla 2.5. Datos extraídos de las curvas de DSC, TGA y DTG para los componentes puros, mezclas físicas y complejos liofilizados de SMR e INM con CD, y de SMR con MEG.

	Evento de deshidratación			Fusión		Evento de descomposición	
	DSC (°C)	TGA (PP 25-100 °C)	DTG (°C)	DSC (°C)	DSC (°C)	TGA (PP 200-350 °C)	DTG (°C)
SMR	φ	0,28%	37,2	237,51 (S)	>270	48,87%	252,81
MEG	φ	0,41%	28,42	130,73 (M)	>200	93,67%	265,72
SMR:MEG SBL	φ	φ	φ	φ	>225	61,87%	270,76
A.	CD pura	131,41	12,49%	52,42	φ	>290	324,47
	SBL	85,25	8,21%	53,12	φ	>240	262,34
	MFT	85,39	7,73%	70,84	125,54 (M)	>213	281,84
	STL	69,06	7,32%	28,93 55,92	φ	175-275 >275	233,85 289,28
B.	CD pura	112,2	5,08%	35,85	φ	>300	337,25
	SBL	56,87	6,14%	28,22	φ	>250	264,25
	MFT	63,09	5,52%	38,12	128,64 (M)	>200	288,85
	STL	61,3	4,98%	35,19	φ	>220	312,19
C.	CD pura	119,57	4,47%	32,93	φ	>300	338,61
	SBL	58,74	6,18%	29,26	φ	>260	285,84
	MFT	63,09	4,28%	37,76	125,75 (M)	>200	277,92
	STL	56,05	3,75%	36,85	φ	>200	286,07

PP: pérdida de peso; φ: no aplicable; (S): pico de fusión corresponde a SMR; (M): pico de fusión corresponde a MEG.

2.3.2.2.2. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA (IR)

La espectrometría infrarroja fue utilizada para evaluar la interacción entre SMR, MEG y β-CD, M-β-CD o HP-β-CD en estado sólido, debido a que a través de la complejación del huésped, ocurren desplazamientos o cambios en el espectro de absorción.¹ Los espectros FT-IR de las sustancias puras, de los sistemas binarios liofilizados (SBL), de las mezclas físicas ternarias (MFT) y de los sistemas ternarios liofilizados (STL), se presentan en la Figura 2.22.

Algunas bandas características de SMR presentaron cambios en el STL en comparación con la MFT y el SBL, como las señales correspondientes a la vibración del anillo aromático (1642 y 1630 cm⁻¹) que se desplazaron hacia frecuencias mayores o menores en el STL con β-CD e HP-β-CD (1557; 1577 y 1556 cm⁻¹, respectivamente) o desaparecieron en comparación con el correspondiente SBL (1548; 1567 y 1575; 1562 cm⁻¹, respectivamente). En particular, las bandas de vibración del anillo pirimidínico (1444 y 1407 cm⁻¹) se modificaron a una sola banda (1423 cm⁻¹) o desaparecieron en el STL con β-CD respecto a la MFT y al SBL (1490; 1444; 1408 and 907 cm⁻¹), lo que puede estar relacionado a la diferente interacción de β-CD con SMR en presencia de MEG, observada en los estudios de RMN. Además, la banda del estiramiento S=O de SMR (1092 cm⁻¹) que se

observó a 1127 cm^{-1} en el SBL y la MFT, se eliminó en el STL con M- β -CD, así como las bandas del estiramiento S-O en la MFT y SBL con β -CD y M- β -CD (967 ; 837 ; 887 y 797 cm^{-1} , respectivamente) se desplazaron (797 a 804 cm^{-1}) o desaparecieron. En adición, muchas otras señales presentes en la región de la huella digital de SMR de los espectros de los SBL y de las MFT se desplazaron en el STL con β -CD (556 a 552 cm^{-1}) o HP- β -CD (855 a 859 cm^{-1}) o desaparecieron con M- β -CD (654 cm^{-1}). Estos resultados confirman que una interacción diferente ocurrió entre SMR, MEG y cada una de las CD cuando los sistemas ternarios son preparados mediante la técnica de liofilización, indicando la formación de nuevos compuestos que difieren de los correspondientes complejos binarios, lo que fue también evidenciado mediante los estudios de RMN y los incrementos de solubilidad observados.

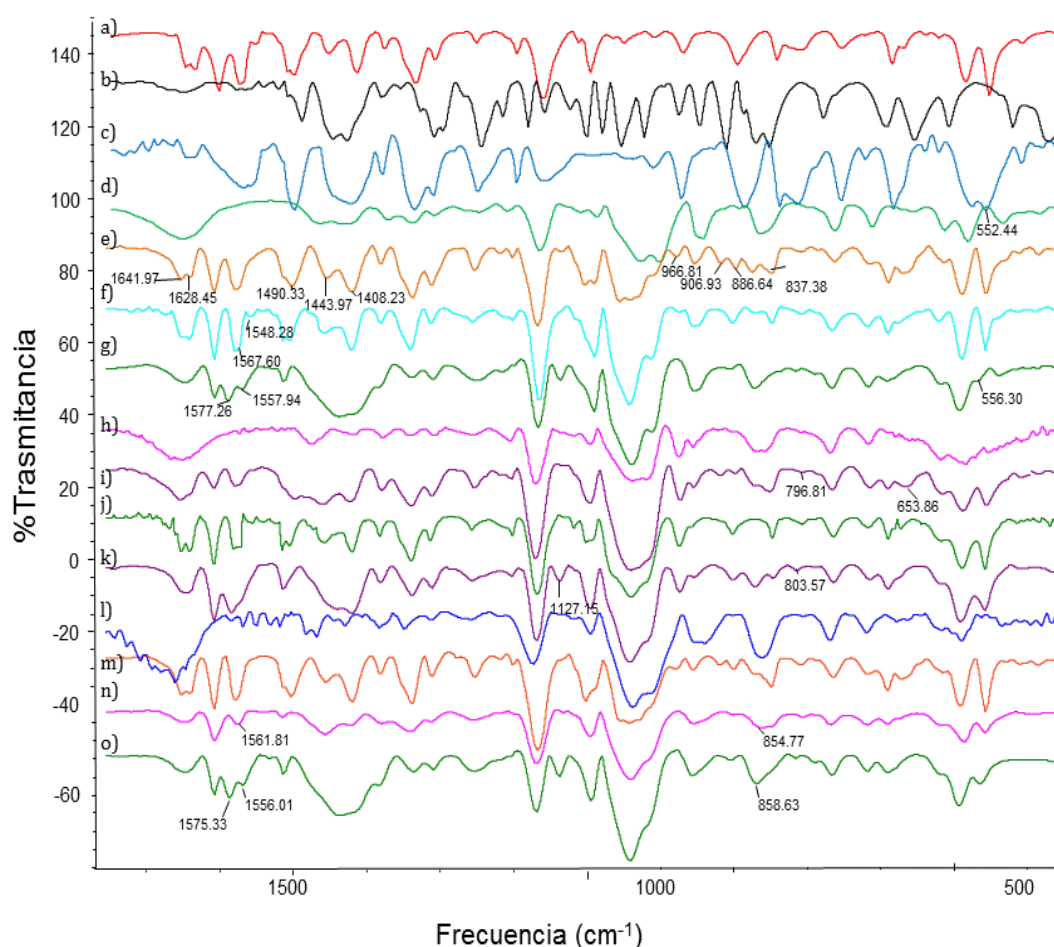


Figura 2.22. Espectros FT-IR de: a) MEG puro; b) SMR pura; c) SBL con MEG; d) β -CD pura; e) MFT con β -CD; f) SBL con β -CD; g) STL con β -CD; h) M- β -CD pura; i) MFT con M- β -CD; j) SBL con M- β -CD; k) STL con M- β -CD; l) HP- β -CD pura; m) MFT con HP- β -CD; n) SBL con HP- β -CD; o) STL con HP- β -CD.

2.3.2.2.3. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).

Los patrones de difracción de Rayos X de polvos de las sustancias puras liofilizadas, los sistemas binarios liofilizados (SBL), las mezclas físicas ternarias (MFT) de los componentes liofilizados y los sistemas ternarios liofilizados (STL), son expuestas en la Figura 2.23.

El estado molecular de los complejos binarios de SMR con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG utilizando DRX fue previamente descrito en la Sección 2.3.1.2.3, donde la presencia de cada especie como sólido aislado fue confirmada en la MFB y una amorfización total de la droga fue inducida cuando los complejos sólidos con CD fueron obtenidos mediante la técnica de liofilización, deducida a partir de la superposición de los patrones de las sustancias puras o mediante la presencia de amplias bandas de difracción, en las cuales no es posible distinguir los picos característicos del IFA, respectivamente. En base a esto, el estado molecular de los complejos ternarios SMR:MEG:CD fue investigado utilizando el mismo procedimiento.

Los difractogramas de las MFT fueron aproximadamente la superposición de los patrones de los materiales puros, del mismo modo que se observó en las MFB. Por otro lado, los STL mostraron patrones de difracción difusos con disminución del carácter cristalino respecto a los SBL, desapareciendo también los picos de difracción cristalinos correspondientes a MEG libre, los que podían detectarse en el sistema liofilizado de SMR:MEG. Esto podría indicar que la combinación de CD y MEG otorga mayor eficacia para favorecer el estado amorfo que los complejos binarios, cuando los complejos ternarios son obtenidos mediante la técnica de liofilización.

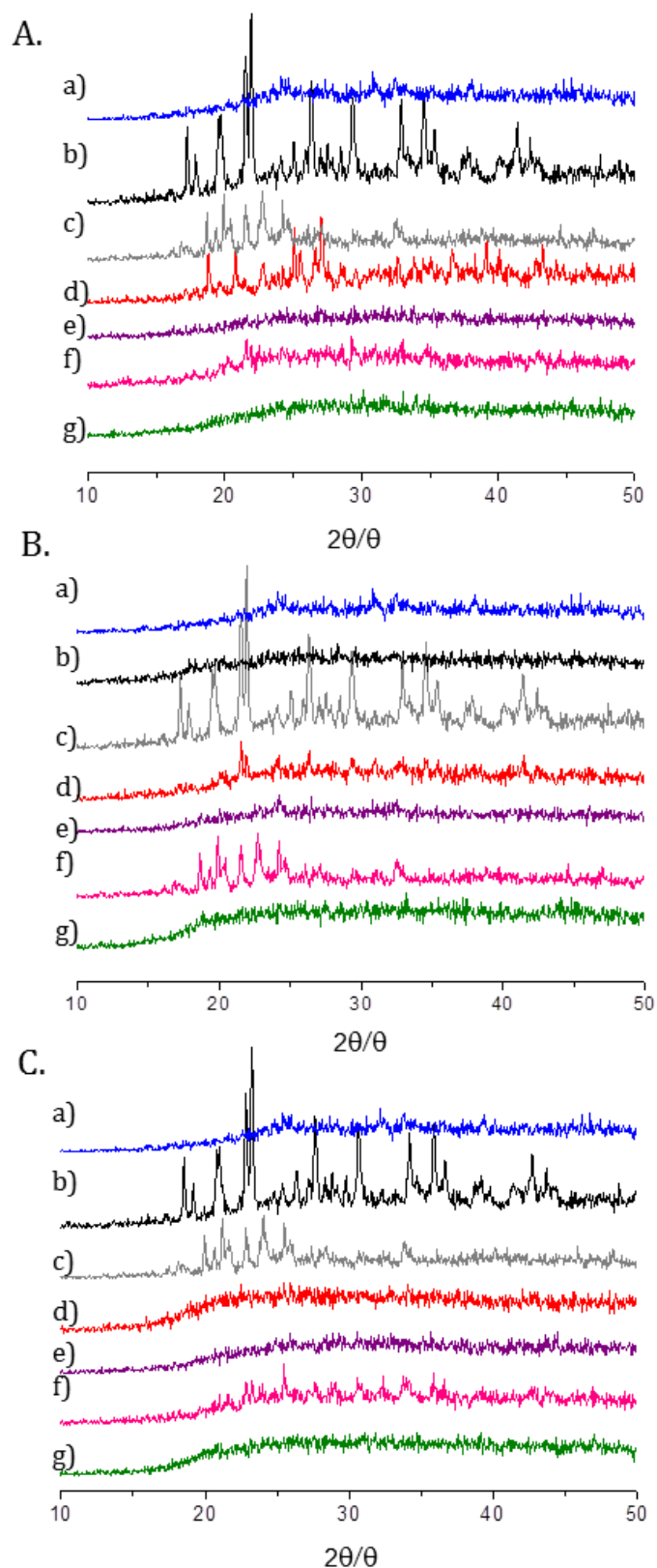


Figura 2.23. Difractogramas de Rayos X de los complejos: A) SMR: β -CD:MEG; B) SMR:M- β -CD:MEG y C) SMR:HP- β -CD:MEG, siendo: a) SMR pura; b) MEG puro; c) SBL con MEG; d) CD pura; e) SBL con CD; f) MFT; g) STL.

2.4. CONCLUSIONES PARCIALES

La formación de complejos de inclusión con CD y sistemas binarios con MEG pudo demostrarse mediante RMN, IR, DSC/TGA y DRX. Los complejos con CD mostraron un aumento significativo en la solubilización en comparación con los IFA libres. MEG produjo crecimientos de solubilidad debido a diversos factores. El mayor incremento fue obtenido con la estrategia de combinar la formación de sistemas binarios con MEG y el ajuste del pH. Estos hallazgos presentan aplicaciones relevantes en la preparación de formulaciones farmacéuticas orales conteniendo los fármacos estudiados.

Por otro lado, se observó un efecto de solubilización adicional al de M- β -CD e HP- β -CD en presencia de MEG. Los estudios de RMN demostraron la formación de complejos ternarios genuinos cuando SMR y MEG son combinados con ambas CD, lo que también fue evidenciado mediante estudios por IR, DSC, TGA y DRX que indicaron la ocurrencia de una interacción diferente en SMR, MEG y M- β -CD o HP- β -CD, cuando los sistemas ternarios son preparados mediante la técnica de liofilización. Además, se observó una mayor eficacia para favorecer el estado amorfo del fármaco con los sistemas ternarios liofilizados en comparación con los complejos binarios. Los sistemas ternarios mostraron una clara superioridad frente a los complejos binarios en términos de solubilidad.

2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ribeiro L, Ferreira D, Veiga F. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *Eur J Pharm Sci* 2003;20:253–66.
2. Ali SM, Asmat F, Maheshwari A. NMR spectroscopy of inclusion complex of D -(-)-chloramphenicol with β -cyclodextrin in aqueous solution. *J Pharm Biomed* 1998;59:835–8.
3. Jansook P, Loftsson T. CD as solubilizers: Effects of excipients and competing drugs. *Int J Pharm* 2009;379:32–40.
4. Araújo MV, Barbosa EK, Lázaro G, Conegero L, Almeida LE, Barreto L, et al. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorg Med Chem* 2008;16:5788–94.
5. Yang B, Lin J, Chen Y, Liu Y. Artemether/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode. *Bioorg Med Chem* 2009;17:6311–7.
6. Iohara D, Hirayama F, Ishiguro T. Preparation of amorphous indomethacin from aqueous 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin solution. *Int J Pharm* 2007;354:70–6.
7. Guo P, Su Y, Cheng Q, Pan Q, Li H. Crystal structure determination of the β -cyclodextrin-p-aminobenzoic acid inclusion complex from powder X-ray diffraction data. *Carbohydr Res* 2011;346:986–90.
8. Xin J, Guo Z, Chen X, Jiang W, Li J, Li M. Study of branched cationic β -cyclodextrin polymer / indomethacin complex and its release profile from alginate hydrogel. *Int J Pharm* 2010;386:221–8.
9. Rawat S, Jain SK. Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:263–7.
10. Ficarra R, Ficarra P, Bella MR Di, Raneri D, Tommasini S, Calabro ML, et al. Study of β -blockers / β -cyclodextrins inclusion complex by NMR, DSC, X-ray and SEM investigation. *J Pharm Biomed* 2000;23:33–40.
11. Brewster ME, Vandecruys R, Peeters J, Neeskens P, Verreck G, Loftsson T. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. *Eur J Pharm Sci* 2008;34:94–103.
12. George SJ, Vasudevan DT. Studies on the Preparation, Characterization, and Solubility of 2-HP- β -Cyclodextrin-Meclizine HCl Inclusion Complexes. *J Young Pharm* 2012;4:220–7.
13. Mishur RJ, Griffin ME, Battle CH, Shan B, Jayawickramarajah J. Molecular recognition and enhancement of aqueous solubility and bioactivity of CD437 by β -cyclodextrin. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:857–60.
14. Chadha R, Gupta S, Shukla G, Jain DVS. Interaction of artesunate with β -cyclodextrin: Characterization, thermodynamic parameters, molecular modeling, effect of PEG on complexation and antimalarial activity. *Results Pharma Sci* 2011;1:38–48.
15. Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2006;329:1–11.

16. Li N, Wei X, Mei Z, Xiong X, Chen S, Ye M, et al. Synthesis and characterization of a novel polyamidoamine-cyclodextrin crosslinked copolymer. *Carbohydr Res* 2011;346:1721–7.
17. Doyagüez EG, Fernández-Mayoralas A. Proline-cyclodextrin conjugates: Synthesis and evaluation as catalysts for aldol reaction in water. *Tetrahedron* 2012;68:7345–54.
18. Zhang G, Liang F, Song X, Liu D, Li M, Wu Q. New amphiphilic biodegradable β -cyclodextrin/poly(L-leucine) copolymers: Synthesis, characterization, and micellization. *Carbohydr Polym* 2010;80:885–90.
19. Guan Z, Wang Y, Chen Y, Zhang L, Zhang Y. Novel approach for synthesis of 2:1 permethylated β -cyclodextrin–C60 conjugate. *Tetrahedron* 2009;65:1125–9.
20. Wang R-Q, Ong T-T, Ng S-C. Synthesis of cationic β -cyclodextrin derivatives and their applications as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr A* 2008;1203:185–92.
21. Dos Santos J-FR, Couceiro R, Concheiro A, Torres-Labandeira J-J, Alvarez-Lorenzo C. Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylated- β -cyclodextrin) hydrogels: synthesis, cytocompatibility, mechanical properties and drug loading/release properties. *Acta Biomater* 2008;4:745–55.
22. Kutyła MJ, Lambert LK, Davies NM, McGeary RP, Shaw PN, Ross BP. Cyclodextrin-crosslinked poly(acrylic acid): Synthesis, physicochemical characterization and controlled release of diflunisal and fluconazole from hydrogels. *Int J Pharm* 2013;444:175–84.
23. Al Omari MM, Daraghmeh NH, El-Barghouthi MI, Zughul MB, Chowdhry BZ, Leharne SA, et al. Novel inclusion complex of ibuprofen tromethamine with cyclodextrins: physico-chemical characterization. *J Pharm Biomed Anal* 2009;50:449–58.
24. Granero GE, Maitre MM, Garnero C, Longhi MR. Synthesis, characterization and *in vitro* release studies of a new acetazolamide e HP- β -CD e TEA inclusion complex. *Eur J Med Chem* 2008;43:464–70.
25. Garnero C, Longhi M. Study of ascorbic acid interaction with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triethanolamine, separately and in combination. *J Pharm Biomed* 2007;45:536–45.
26. Zoppi A, Garnero C, Linck YG, Chattah AK, Monti GA, Longhi MR. Enalapril: β -CD complex: Stability enhancement in solid state. *Carbohydr Polym* 2011;86:716–21.
27. Chen C, Chen F, Wu A, Hsu H, Kang J. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility, photostability and *in-vitro* permeability of alkannin / shikonin enantiomers. *Int J Pharm* 1996;141:171–8.
28. Jarho P, Urtti A, Pate DW, Pekka S, Tomi J. Increase in aqueous solubility, stability and *in vitro* corneal permeability of anandamide by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm* 1996;137:209–16.
29. Higuchi T, Connors K. Phase solubility techniques. In: Reilly C ed. W, editor. *Advances in analytical chemistry and instrumentation*. New York: 1965. page 117–212.
30. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:645–66.

31. Loftsson T. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. 2005;302:18–28.
32. Serajuddin ATM. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:603–16.
33. Tarsa PB, Towler CS, Woollam G, Berghausen J. The influence of aqueous content in small scale salt screening - Improving hit rate for weakly basic, low solubility drugs. *Eur J Pharm Sci* 2010;41:23–30.
34. Gupta P, Bansal AK. Ternary amorphous composites of celecoxib, poly(vinyl pyrrolidone) and meglumine with enhanced solubility. *Pharmazie* 2005;60:830–6.
35. Frézard F, Martins PS, Bahia APCO, Le Moyec L, de Melo AL, Pimenta AMC, et al. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ β -cyclodextrin nanoassemblies. *Int J Pharm* 2008;347:102–8.
36. Gupta P, Bansal AK. Modeling of drug release from celecoxib-PVP-meglumine amorphous system. *PDA J Pharm Sci Technol* 2005;59:346–54.
37. Gupta P, Bansal A. Molecular interactions in celecoxib-PVP- meglumine amorphous system. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:303–10.
38. Barillaro V, Dive G, Bertholet P, Evrard B, Delattre L, Frederich M, et al. Theoretical and experimental investigations of organic acids / cyclodextrin complexes and their consequences upon the formation of miconazole / cyclodextrin / acid ternary inclusion complexes. *Int J Pharm* 2007;347:62–70.
39. Mura P, Maestrelli F, Cirri M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and aminoacids. *Int J Pharm* 2003;260:293–302.
40. Redenti E, Szente L, Szejtli J. Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications. *J Pharm Sci* 2001;90:979–86.
41. Redenti E, Szente L, Szejtli J. Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications. *J Pharm Sci* 2000;89:1–8.
42. Gladys G, Claudia G, Marcela L. The effect of pH and triethanolamine on sulfisoxazole complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci* 2003;20:285–93.
43. Palma SD, Tartara LI, Quinteros D, Allemandi DA, Longhi MR, Granero GE. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- β -CD and TEA for topical ocular administration. *J Control Release* 2009;138:24–31.
44. Constable PD. Acid-base assessment: when and how to apply the Henderson-Hasselbalch equation and strong ion difference theory. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2014;30:295–316, v.
45. Özdemir N, Erkin J. Enhancement of dissolution rate and bioavailability of sulfamethoxazole by complexation with β -cyclodextrin. *Drug Dev Ind Pharm* 2012;38:331–40.
46. Ge X, Huang Z, Tian S, Huang Y, Zeng C. Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity. *Carbohydr Polym* 2012;89:208–12.
47. Maestrelli F, Cirri M, Mennini N, Zerrouk N, Mura P. Improvement of oxaprozin solubility and permeability by the combined use of cyclodextrin, chitosan, and bile components. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;78:385–93.

48. Shi JH, Zhou YF. Inclusion interaction of chloramphenicol and heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin: Phase solubility and spectroscopic methods. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2011;83:570–4.
49. Qiang Z, Adams C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 2004;38:2874–90.
50. Basavaraj S, Sihorkar V, Shantha Kumar TR, Sundaramurthi P, Srinivas NR, Venkatesh P, et al. Bioavailability enhancement of poorly water soluble and weakly acidic new chemical entity with 2-hydroxy propyl- β -cyclodextrin: selection of meglumine, a polyhydroxy base, as a novel ternary component. *Pharm Dev Technol* 2006;11:443–51.
51. Linares M, de Bertorello MM, Longhi M. Solubilization of naphthoquinones by complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm* 1997;159:13–8.
52. Rekharsky M V, Goldberg RN, Schwarz FP, Tewari YB, Ross PD, Yamashoji Y, et al. Thermodynamic and Nuclear Magnetic Resonance Study of the Interactions of α - and β -Cyclodextrin with Model Substances: Phenethylamine, Ephedrines, and Related Substances. *J Am Chem Soc* 1995;117:8830–40.
53. Schneider H, Hacket F, Rudiger V, Ikeda H. NMR studies of Cyclodextrins and Cyclodextrins Complexes. *Chem Rev* 1998;98:1755–86.
54. Delrivo A, Zoppi A, Longhi MR. Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state. *Carbohydr Polym* 2012;87:1980–8.
55. Loukas YL, Vraka V, Gregoriadis G. Use of a nonlinear least-squares model for the kinetic determination of the stability constant of cyclodextrin inclusion complexes. *Int J Pharm* 1996;144:225–31.
56. Roberts W, McMurray W, Rainey P. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (glucantime). *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1076–82.
57. Turczan J, Medwick T. Identification of sulfonamides by NMR spectroscopy. *J Pharm Sci* 1972;61:434–43.
58. Anguiano-Igea S, Otero-Espinar FJ, Vila-Jato JL, Blanco-Méndez J. Interaction of clofibrate with cyclodextrin in solution: phase solubility, ^1H NMR and molecular modelling studies. *Eur J Pharm Sci* 1997;5:215–21.
59. Linde GA, Junior AL, Faria EV de, Colauto NB, Moraes FF de, Zanin GM. The use of 2D NMR to study β -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides. *Food Res Int* 2010;43:187–92.
60. Jullian C, Cifuentes C, Alfaro M, Miranda S, Barriga G, Olea-Azar C. Spectroscopic characterization of the inclusion complexes of luteolin with native and derivatized β -cyclodextrin. *Bioorg Med Chem* 2010;18:5025–31.
61. Szente L, Osa T, editors. *Comprehensive supramolecular chemistry*. Vol. 3. Oxford: Pergamon Press; 1996.

CAPÍTULO III:

MICROEMULSIONES

3.1. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de este capítulo fue desarrollar microemulsiones biocompatibles para la vehiculización de fármacos escasamente solubles en agua. En base a los resultados obtenidos con complejos con CD y MEG y con microemulsiones, resulta de interés examinar otras estrategias de formulación a partir de microemulsiones modificadas biocompatibles mediante la incorporación de β -ciclodextrina (β -CD), metil- β -CD (M- β -CD), hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) o MEG en la fase acuosa de los sistemas.

Los sistemas obtenidos fueron caracterizados utilizando la metodología de Diagrama Pseudo-ternario de Fases, microscopía de luz polarizada, espectroscopía RMN- ^1H , conductividad y determinaciones del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta. Se evaluó la cantidad de fármaco incorporado en los sistemas utilizando SMR e INM como fármacos modelo escasamente solubles en agua, con el fin de que los datos obtenidos sean también de utilidad para otros fármacos con propiedades fisicoquímicas similares.

3.1.1. MICROEMULSIONES (ME)

Las microemulsiones (ME) son dispersiones isotrópicas, ópticamente transparentes, nano-estructuradas y termodinámicamente estables, compuestas por dos líquidos inmiscibles, una fase acuosa (W) y una fase oleosa (O), estabilizados mediante una capa interfacial de surfactantes (S) generalmente asociada a un cosurfactante.¹⁻⁵ Las ME pueden presentar diferentes microestructuras, las cuáles son expuestas a continuación de acuerdo a la clasificación de Winsor y se encuentran representadas en la Figura 3.1:^{6,7}

- **O/W:** ME aceite en agua o ME en equilibrio con la fase oleosa (O) (**Winsor I**)
- **W/O:** ME agua en aceite o ME en equilibrio con la fase acuosa (W) (**Winsor II**)
- ME bicontinuas o de fase media o ME en equilibrio con la fase acuosa (W) y la fase oleosa (O) (**Winsor III**)
- ME de fase simple o ME "pura" (**Winsor IV**)

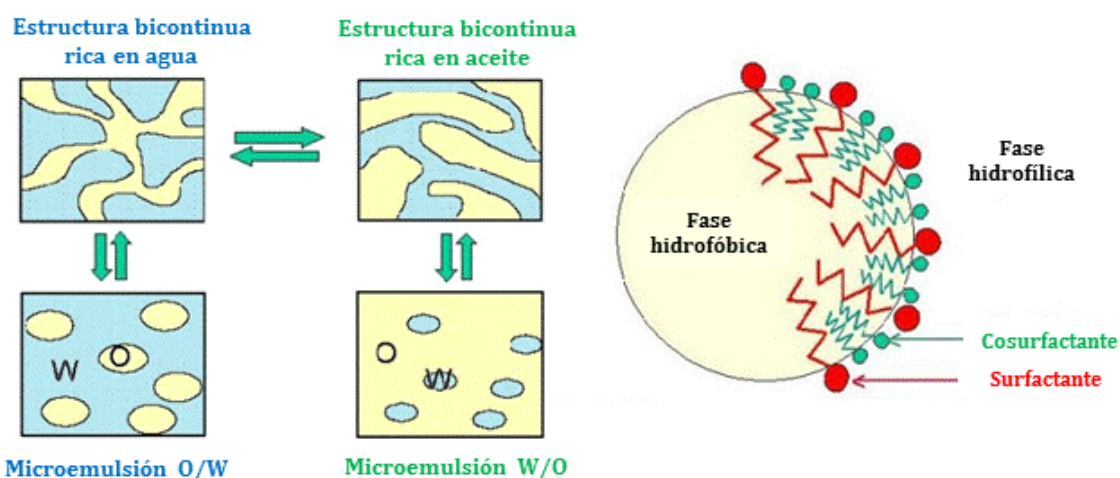


Figura 3.1. Diferentes microestructuras de microemulsiones de acuerdo a la Clasificación de Winsor.

La formación de microemulsiones agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W) depende de las propiedades de la mezcla de surfactantes, de la proporción aceite/surfactante y de la temperatura.⁸

3.1.2. MICROEMULSIONES DE USO FARMACÉUTICO

En las últimas décadas, fueron publicados un gran número de investigaciones acerca de sistemas microemulsionados para aplicación farmacéutica.^{4-6,9-13} El estudio de microemulsiones en la vehiculización de fármacos se encuentra bien descrito en la literatura y muestra una influencia favorable sobre la modificación de la biodisponibilidad de numerosos fármacos. Por ejemplo la modulación de la actividad antimicrobiana de glicerol monolaurato utilizando ME O/W,⁵ microemulsiones a base de tween que han sido desarrolladas para la vehiculización de dosis fijas de combinaciones de tres fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis,⁶ para aumentar la solubilidad de fármacos tales azitromicina,¹⁴ cloranfenicol⁴ y varios péptidos hidrosolubles de diferentes estructuras moleculares, tamaño y carga.⁸ Además, estudios recientes sugieren que las microemulsiones son potenciales moduladores de la absorción transdérmica de fármacos hidrofílicos y lipofílicos, tales como naproxeno,¹⁵ testosterona,¹⁶ curcumina,² T4,¹⁷ ketoprofeno, lidocaína y cafeína.¹⁸

3.1.3. COMPONENTES DE MICROEMULSIONES

Una de las principales ventajas de las microemulsiones es que pueden obtenerse a partir de componentes biocompatibles para ser utilizadas como vehículo de ingredientes farmacológicamente activos.¹⁹⁻²³ La fosfatidilcolina (Figura 2 a) es un surfactante de origen natural que forma parte de las membranas celulares, por ende, es altamente biocompatible y es ampliamente utilizado como adyuvante farmacéutico para todas las vías de administración incluyendo la vía endovenosa.^{1,24,25}

La estructura de una microemulsión juega un papel muy importante en la liberación de los fármacos.^{13,19,22,26} Los ácidos grasos mono-insaturados, tales como ácido oleico, han recibido atención debido a su capacidad como promotores de la permeación.¹⁶ Un análisis típico de aceite de soja puro indica que los principales ácidos grasos que lo componen son ácido palmítico (9-13%), ácido esteárico (3-6%), ácido linoleico (50-57%), ácido oléico (17-26%) y ácido linolénico (5-10%) (Figura 3.2. b-e).

Los surfactantes son moléculas que contienen una cabeza formada por un grupo polar y una cola apolar, que presentan un fuerte dipolo químico, activas en superficie y con capacidad de autoagregación en micro/nanoestructuras. Estos compuestos pueden ser iónicos (catiónicos o aniónicos), no iónicos o zwitteriónicos. Las moléculas de surfactantes se auto-asocian tanto mediante fuerzas inter- e intramoleculares como también debido a factores entrópicos. El balance hidrofílico-lipofílico (HLB) del sistema de surfactantes debe ser considerado para racionalizar el comportamiento del mismo. En general, sistemas surfactantes con valores de HLB de 3-6 favorecerán la formación de microemulsiones agua en aceite (W/O), mientras que sistemas con valores de HLB de 8-18 se prefieren para formar microemulsiones aceite en agua (O/W).²⁷ El interés en el uso de surfactante no iónicos asociados a cosurfactantes, en la composición de microemulsiones, es común debido

a su alta estabilidad, baja toxicidad y a la biodegradabilidad de estos compuestos.^{3,6,16} El aceite de castor hidrogenado polioxietilenglicerol (PEG)-40 (Figura 3.2 f) es un surfactante no-iónico para uso farmacéutico^{28,29} que puede proveer las condiciones necesarias para estabilizar microemulsiones O/W cuando es utilizado en mezclas de surfactantes.^{9,30,31}

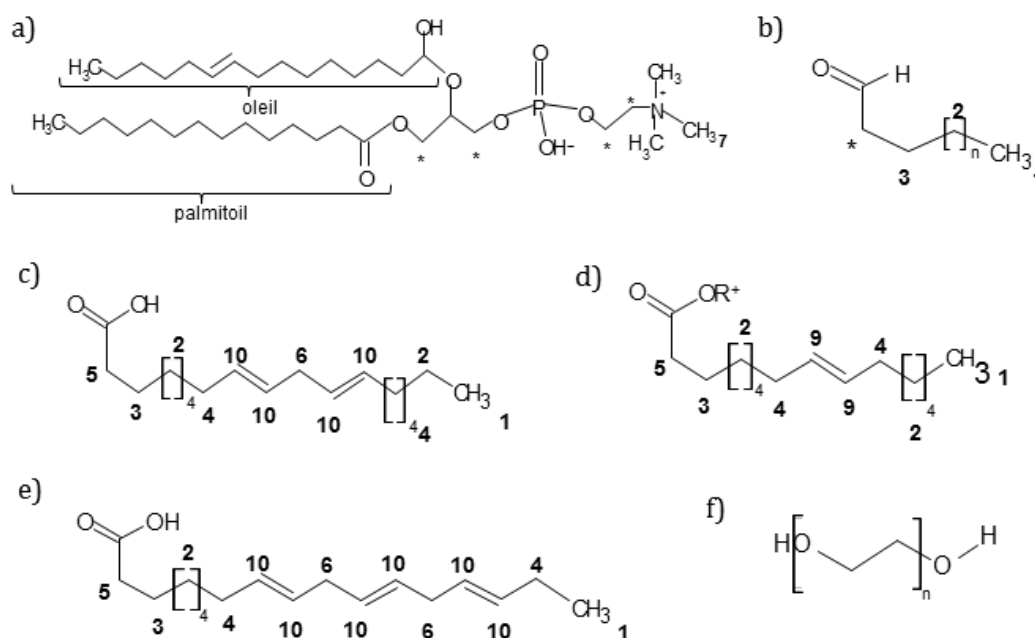


Figura 3.2. Estructuras químicas de surfactantes y de ácidos grasos componentes de microemulsiones: a) fosfatidilcolina de soja (FCS); b) ácido palmítico (O) o ácido esteárico (O) cuando : $n=12$ o $n=14$, respectivamente; c) ácido linoleico(O); f) Eumulgin® (S); *: señales débiles indistinguibles mediante RMN-¹H.

3.1.4. MICROEMULSIONES MODIFICADAS MEDIANTE LA ADICIÓN DE LIGANDOS

Las microemulsiones requieren concentraciones altas de surfactantes para poder proveerles muy baja tensión interfacial. Sin embargo, niveles muy altos de estos pueden resultar inaceptables debido a bioincompatibilidad, desempeño o razones económicas.³ Las ciclodextrinas (CD) son ampliamente utilizadas para la formación de complejos con fármacos debido a su habilidad de unirse a moléculas orgánicas en solución acuosa y en estado sólido mediante enlaces no covalente,^{32,33} lo que es exitosamente aplicado para mejorar las propiedades farmacéuticas de fármacos.^{34,35} Los IFA que forman complejos de inclusión con CD normalmente exhiben una mayor solubilidad acuosa³⁵⁻³⁸ y una mayor estabilidad química que la especie libre.³⁹⁻⁴³ Por otro lado, la *N*-acetil glutamina, también conocida como meglumina (MEG), ha demostrado ser un contraión adecuado para la formación de sales con fármacos ácidos débiles, lo que constituye una estrategia para aumentar la solubilidad de los mismos,⁴⁴ modular la tasa de liberación,⁴⁵⁻⁴⁷ y estabilización.⁴⁷ En el capítulo II fueron expuestos los resultados de los complejos de

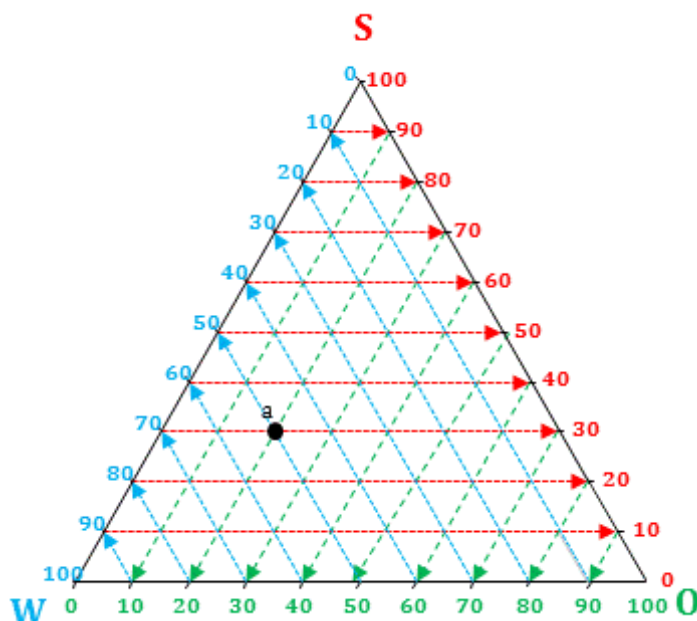
inclusión de SMR e INM con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG a partir de los cuales se obtuvieron incrementos significativos de la solubilidad acuosa de ambos fármacos.

La interacción de IFA con microemulsiones en combinación con CD o MEG, puede mejorar notablemente las propiedades no deseadas de ingredientes farmacológicamente activos, pudiendo incrementar los beneficios individuales de los sistemas por separado. Además, la adición de ligandos, como cosurfactantes en microemulsiones, puede modificar la estabilidad y estructura de los sistemas permitiendo reducir la cantidad utilizada de surfactantes. En base a los resultados obtenidos con complejos con CD y MEG, así como con microemulsiones, resulta de interés examinar varias estrategias de formulación a partir de microemulsiones modificadas biocompatibles, mediante la incorporación de β -ciclodextrina (β -CD), metil- β -CD (M- β -CD), hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) o MEG en la fase acuosa de los sistemas, y los resultados se presentan en la Sección 3.3.2.

3.1.5. METODOLOGÍA DE CARACTERIZACIÓN DE MICROEMULSIONES

3.1.5.1. DIAGRAMA PSEUDO-TERNARIOS DE FASES

Los Diagramas Pseudo-ternarios de Fases (DPF) son triángulos equiláteros que describen el comportamiento de fase de un sistema según su composición y proporcionan la visualización de las diferentes fases formadas con un sistema W/S/O.^{15,55} Los vértices representan los componentes puros, cada lado del triángulo representa las mezclas binarias de dos componentes y el interior representa mezclas de los tres componentes del sistema.¹⁵ A modo de ejemplo, el punto a de la Figura 3.3 representa una formulación compuesta por un 50% de **W**, un 20% de **O** y un 30% de **S**. A partir de los DPF pueden describirse las condiciones experimentales ideales en las cuales los componentes deben ser combinados para la formación de microemulsiones termodinámicamente estables.^{9,15} El procedimiento más empleado para la construcción del DPF es la preparación de una serie de mezclas binarias y la posterior titulación con el tercer componente, evaluando la mezcla tras cada adición, pudiendo necesitar calentamiento o sonicación.⁵⁵ La evaluación de las formulaciones puede realizarse tanto visualmente como aplicando técnicas apropiadas de caracterización, como microscopía de luz polarizada, conductividad y dispersión de luz dinámica.



*Figura 3.3. Diagrama Pseudo-ternario de Fases. El punto *a* representa una formulación compuesta por un 50% de W, un 30% de O y un 20% de S.*

3.1.5.2. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Como fue mencionado anteriormente, las ME son sistemas coloidales isotrópicos y gracias a ellos pueden ser diferenciados de los cristales líquidos debido a que los mismo tienen un comportamiento anisotrópico y muestran comportamiento birrefringente bajo el microscopio de luz polarizada. Para observar el efecto de isotropía birrefringente, se requiere luz polarizada, la cual consiste en ondas de luz que sólo se propagan en una dirección, y puede generarse mediante el uso de filtros polarizantes o polarizadores. Por encima del objetivo un segundo filtro es posicionado, llamado analizador, el cual es usualmente posicionado a 90° del otro filtro. Luz blanca de una fuente ordinaria de luz es irradiada en dirección al polarizador a través del cual podrá pasar únicamente la luz propagada en una determinada dirección, lo que conduce a la producción de luz polarizada en el plano. La misma, subsecuentemente viaja a través de la muestra y es desdoblada un haz de luz ordinario y uno extraordinario si la muestra es anisotrópica y muestra birrefringencia (tal como cristales líquidos de fases lamelares, hexagonales o hexagonales reversos). Por otro lado, si la muestra es isotrópica, tal como microemulsiones, la luz atravesará la muestra sin disturbios. Por este motivo, la microscopía de luz polarizada permite un estudio más en detalle de las fases observadas en un diagrama pseudoternario de fases.⁵⁶

3.1.5.3. CONDUCTIVIDAD (σ)

El principio para el estudio del comportamiento de fase de una ME, mediante la conductividad, recae en la propiedad conductora de la corriente eléctrica del agua.⁴⁸ Recientemente, numerosos estudios han sido realizados acerca de la correlación existente entre la estructura de las ME con su comportamiento electro-conductor,^{6,16,49-51} permitiendo la determinación del fenómeno de percolación, en el cual la conductividad

permanece alta hasta cierta fracción de volumen crítico de agua (Φ_c), donde ocurre un cambio dramático en la conductividad debido a una inversión de fase:

$\%W < \Phi_c \rightarrow$ Existencia de gotículas W/O, aisladas, inmersas en la fase continua oleosa no conductora, las cuales contribuyen muy poco a la conductividad (Región W/O, Figura 3.4)

$\%W > \Phi_c \rightarrow$ Existencia de gotículas en contacto, formando dominios cuya formación incrementa rápidamente al alcanzar percolación, observándose grandes cambios en la conductividad. (Región O/W, Figura 3.4)

Si ocurre un cambio drástico en la conductividad a una determinada fracción de volumen de agua, se sugiere una inversión de fase de micelas invertidas W/O a micelas directas O/W. Esta transición es explicada mediante la formación de estructuras bicontinuas las cuales poseen tensión interfacial muy baja. Este tipo de ME presentan conductividades relativamente mayores que las W/O.^{13,48}

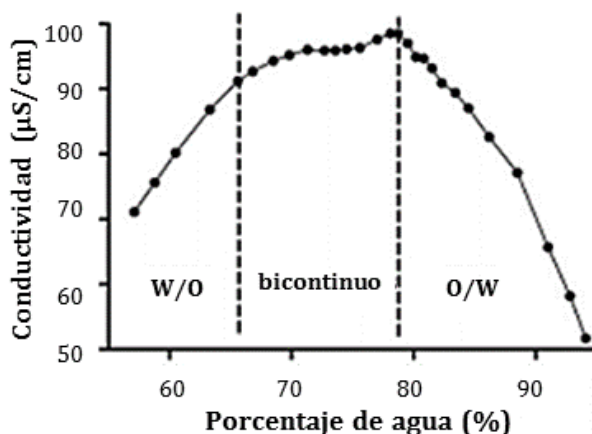


Figura 3.4. Curva de Conductividad en función del porcentaje de agua (%), en el que puede observarse el fenómeno de percolación en ME.

Finalmente, con el incremento en la proporción del agua en el sistema, la presencia de gotículas de agua en aceite produce una disminución en la conductancia, estableciendo los límites de la existencia de cada tipo de estructura en el sistema. De hecho, siendo el valor de conductividad del agua destilada inferior a $11 \mu\text{S}/\text{cm}$,⁵² la considerable reducción final de la conductividad es principalmente debida a la dilución por el medio acuoso de las microgotículas oleosas.

3.1.5.4. DIÁMETRO DE PARTÍCULAS

En el campo de la industria farmacéutica, el diámetro de las gotículas de la fase interna de microemulsiones que contienen ingredientes activos influye en parámetros o características críticas, incluyendo la uniformidad de contenido, disolución y tasa de absorción.⁵³ Diámetros de partículas pequeños y valores altos de carga de superficie (potencial zeta) incrementarán la estabilidad de microemulsiones.⁵⁴⁻⁵⁶ Un alto contenido en gotículas submicrónicas conduce a considerables aumentos en el área de superficie

produciendo mejoras en la absorción.⁵⁷⁻⁵⁹ La caracterización de la influencia de cada componente, en el diámetro de las gotículas oleosas de una microemulsión, es de suma importancia ya que las dimensiones de la fase interna tienen un impacto directo sobre la biodisponibilidad del fármaco incorporado.^{12,26} La metodología de dispersión de Luz Dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS) ha sido descrita como una técnica apropiada para la determinación del diámetro de partículas de microemulsiones.²⁶ Mediante la misma es posible determinar el diámetro hidrodinámico de partículas suspendidas en un líquido. Una preparación coloidal se encuentra en estado de movimiento aleatorio debido al movimiento Browniano. La velocidad de una dada gotícula es inversamente proporcional a su tamaño, por lo cual gotículas menores se moverán más rápido que los de mayor tamaño. Cuando la fase dispersa de una microemulsión es iluminada por un láser, el movimiento, y por ende el tamaño de las estructuras, puede ser medido mediante el análisis de la tasa a la cual la intensidad de la luz fluctúa como resultado de la dispersión de luz.⁶⁰ La velocidad del movimiento Browniano se encuentra definido por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión translacional (D) a partir del cual puede calcularse el tamaño de una partícula mediante la utilización de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{k T}{3 \pi \eta D}$$

donde d(H) es el diámetro hidrodinámico; D es el coeficiente de difusión translacional; k es la constante del Boltzmann; T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad.²²

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. MATERIALES

Sulfamerazina e Indometacina fueron obtenidos de Parafarm®, Argentina. β -CD ($M_w = 1135$), M- β -CD ($M_w = 1190$), HP- β -CD ($M_w = 1325$) y MEG fueron proporcionados por Sigma Aldrich®, USA; Para la preparación de las ME se utilizaron Fosfatidilcolina de soja (FCS), (Degussa Texturants, Alemania); Polioxietilenglicerol trihidroxiestearato (PEG)-40 (Eumulgin® HRE 40) (EU) (número CAS 61788-85-0, proporcionado por Pharma Special, São Paulo, Brazil) y Oleato de Sodio (OS) como sistema de surfactantes (S). El oleato de sodio fue obtenido mediante la reacción estequiométrica de ácido oléico con NaOH 1 M durante 30 minutos. El precipitado formado fue filtrado y lavado con 3 porciones de 100 mL de acetona. La fase oleosa (O) fue constituida por Aceite de Soja (AS) (Liza®), mientras que la fase acuosa (W) fue conformada por Agua o Solución Reguladora de pH de Fosfatos (SRF). El agua purificada fue obtenida por un sistema de purificación Millipore Milli-Q. Todos los demás materiales y solventes utilizados fueron de grado analítico o superior.

3.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.2.1. DIAGRAMA PSEUDO-TERNARIO DE FASES (DPF).

Los diagramas pseudo-ternarios de fases fueron realizados a partir de estudios en nuestro laboratorio acerca de los valores de Balance Hidrofílico-Lipofílico (HBL) para el mismo sistema de surfactantes.⁹ Se seleccionó un sistema de surfactantes conteniendo FCS/EU/OS (35:35:30) (S) correspondiente a un HBL=12. Se prepararon mezclas semisólidas en proporciones 1:9 a 9:1 de fase oleosa/sistema de surfactantes (O/S) (1,0 g), las cuales fueron tituladas con la fase acuosa bajo agitación ultrasónica utilizando un equipo Ultrasonic Liquid Processor, Heat System XL 2020. La totalidad del experimento fue llevado a cabo a temperatura ambiente.

Se registró la transición de mezclas semisólidas a dispersiones opacas (emulsiones), de emulsiones (EM) a microemulsiones (ME) translúcidas o sistemas con separación de fases (SF), las cuales fueron reproducibles con una precisión de 0,1 mL. Para las ME conteniendo los fármacos, se adicionaron 0,021 g de SMR o 0,0071 g de INM a la mezcla O:S previo a la titulación con la fase acuosa y posteriormente, se procedió del mismo modo que con las ME sin fármaco.

Además, se construyeron los DPF de ME conteniendo 1,8% β -CD, 12% M- β -CD, 2,4% HP- β -CD o 5% MEG como fase acuosa, de acuerdo a datos experimentales previos acerca de la máxima solubilidad acuosa de cada ligando.

3.2.2.2. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP).

ME seleccionadas a partir del DPF con una cantidad fija del 5% (Tabla 3.1) de O fueron analizadas en ausencia y en presencia de los fármacos mediante Microscopía de Luz Polarizada (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena), con la finalidad de diferenciar microemulsiones (comportamiento no birefringente) de estructuras líquido cristalinas (comportamiento birefringente). Las imágenes microscópicas fueron capturas con una cámara digital (Nikon CoolPix 990, Japan) accesoria al microscopio.

Tabla 3.1. Composición de las muestras analizadas mediante microscopía de luz polarizada.

Muestra	O%	S%	W%
A	5	8	87
B	5	15	80
C	5	24	71
D	5	71	65
E	5	65	50

3.2.2.4. CONDUCTIVIDAD (σ)

Con el fin de evaluar la validez de la teoría de percolación en los sistemas estudiados, se realizó un seguimiento de la conductividad de las ME variando diferentes componentes, como la cantidad de agua, la relación O/S, la incorporación de fármacos o ligandos. Las ME conteniendo ligandos fueron evaluadas a tres niveles de concentración de estos (0,005; 0,010 y 0,015 M) incorporados en la fase acuosa. Se utilizó un conductímetro Digimed® DM-32 con una constante de celda de 1 cm⁻¹, previamente calibrado con una solución estándar 1 M de KCl correspondiente a un valor de 1413 μ S/cm. Las mediciones se realizaron por duplicado a 25 \pm 1 °C. La composición de las ME seleccionadas para todos los estudios se presenta en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Composiciones porcentuales (p/p) de microemulsiones seleccionadas a partir de DPF.

Composición	ME ₁	ME ₂	ME ₃	ME ₄	ME ₅
FC	8,5	7,0	5,0	4,0	2,5
EU	8,5	7,0	5,0	4,0	2,5
OS	1,5	3,0	5,0	6,0	7,5
O	1,5	3,0	5,0	6,0	7,5
W	80	80	80	80	80
O/S	0,0796	0,1765	0,3333	0,4286	0,6000

3.2.2.5. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN (P)

Con el objetivo de simular la partición de los fármacos en las ME, se llevaron a cabo estudios de partición entre las fases acuosas utilizadas y aceite de soja. Los coeficientes de partición fueron calculados de acuerdo a la concentración remanente de SMR o INM en la fases luego de la separación de sistemas fase acuosa/fase oleosa 1:1.

Para ello, 3 mL de agua, SRF 7,4 o SRF 8,0 y aceite de soja fueron adicionados a 5 o 10 mg de SMR o INM, respectivamente. Las mezclas fueron mantenidas a $25 \text{ ó } 37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación constante a 200 rpm durante 72 h utilizando un equipo Shaker Ferca®, Argentina, y fueron posteriormente centrifugadas durante 30 min a 3000 rpm para la separación de fases con una centrifuga Rolco®, Argentina. La concentración de los sustratos fue determinada a partir de la absorbancia de las muestras utilizando un Espectrofotómetro UV-vis Agilent Technologies® Cary 60.

Los coeficientes de partición (P) fueron calculados utilizando la siguiente ecuación:

$$P = C_{FO}/C_{FA}$$

donde C_{FO} y C_{FA} fueron las concentraciones de fármaco en la fase oleosa y acuosa, respectivamente.

3.2.2.6. ESTUDIOS DE INCORPORACIÓN DE FÁRMACOS EN MICROEMULSIONES

Con el propósito de evaluar la influencia de la composición de los sistemas en la cantidad incorporada de SMR o INM, se seleccionaron muestras conteniendo diferentes relaciones O/S a partir de la región de ME del DPF, con una concentración de agua fija de 80% p/p, para la obtención de ME O/W biocompatibles (Tabla 3.2). Las mismas fueron preparadas mediante la adición lenta de la fase O a la mezcla semisólida FCS/EU/OS. Luego, el correspondiente volumen de W fue incorporado con agitación constante para permitir la disolución de los surfactantes. La dispersión fue posteriormente sonicada utilizando un ultrasonificador Ultrasonic Liquid Processor, Heat System XL 2020 durante un período de 10 minutos, con pulsos de 59 segundos, cada 20 segundos. Se disolvieron cantidades en exceso de SMR o INM directamente dentro de la ME líquida y la dispersión fue sonicada nuevamente por un período de 15 min. Las suspensiones fueron filtradas a través de membranas de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de poro y, posteriormente, apropiadamente diluidas en etanol y analizadas a 230 o 270 nm para SMR o INM, utilizando un Espectrofotómetro Hewlett Packard® 89090A UV-visible con cuñs de 1 cm de paso óptico. Las cantidades solubilizadas fueron graficadas en función de la relación O/S.

Para la evaluación de la adición de ligandos en la ME sobre la cantidad incorporada de los fármacos, las formulaciones fueron preparadas utilizando diferentes contenidos de la fase acuosa: en ausencia de ligandos, 1,8% β -CD, 12% M- β -CD, 2,5% HP- β -CD o 5% MEG en agua o en SRF pH 8. Además, con el fin de elucidar la afinidad de los fármacos por los ligandos en los sistemas, las constantes aparentes de formación de los complejos fármaco:CD (K_c) fueron determinadas en función de la concentración de ligando adicionada

([CD]). Debido a que los diagramas de solubilidad de fases de estos complejos fueron de tipo A_L (ver Capítulo II) lo que permitió asumir la formación de complejos de estequiometría 1:1, las K_{CB} fueron calculadas utilizando las pendientes obtenidas a partir del análisis de regresión lineal de las curvas de incorporación utilizando la siguiente ecuación:

$$K_c = \frac{\text{pendiente}}{S_0 (1 - \text{pendiente})}$$

donde S_0 es la solubilidad del fármaco puro.

Para la ME en ausencia de ligando, la K_c fue también calculada, ya que provee información acerca de la afinidad del fármaco por la gotícula surfactante/fase oleosa dispersa en la fase acuosa, ya que son capaces de incorporar a los fármacos en la fase interna oleosa o en la interfase, y a la vez que las CD contribuyen a reducir la constante dieléctrica del medio, incrementando la disolución de fármacos lipofílicos.

3.2.2.7. DETERMINACIÓN DEL MODO DE INTERACCIÓN FÁRMACO-COMPONENTES.

Las señales de los espectros de RMN- 1H de la ME fueron asignadas en base a los espectros de los componentes puros. A partir de las diferencias en los corrimientos químicos de las señales de la ME, en presencia o en ausencia de fármacos, se evaluó el modo de interacción entre ellos. Los estudios de RMN- 1H fueron realizados a 298 K en un Espectrómetro Bruker® Advance II de Alta resolución utilizando tubos de 5 mm de diámetro. Los espectros de las ME, en presencia y en ausencia de fármacos fueron obtenidos tras la incorporación de 0,1 mL de D_2O a 0,5 mL de ME (5/15/80) O:S:W en presencia y en ausencia de los fármacos. Las ME conteniendo ligandos fueron preparadas mediante la utilización de diferentes composiciones de las fases acuosas (agua, 1,8% β -CD; 12% M- β -CD; 2,5% HP- β -CD o 5% MEG en agua). Los espectros de los componentes puros fueron obtenidos mediante la dilución de cantidades apropiadas en D_2O para FCS, EU y OS o en $DCCl_3$ para el aceite de soja. Todos los estudios fueron realizados a 400,16 MHz y los datos fueron procesados utilizando el software Bruker® TOPSPIN 2.0. La señal residual del solvente (4,80 ppm) fue utilizada como referencia interna. Los cambios inducidos en los corrimientos químicos ($\Delta\delta$) para los fármacos y los componentes de la ME, originados debido a la interacción, fueron calculados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\Delta\delta = \delta_{ME \text{ con Fármaco}} - \delta_{ME \text{ vacía}}$$

$$\Delta\delta = \delta_{\text{fármaco en ME}} - \delta_{\text{fármaco}}$$

Por otro lado, para las ME conteniendo ligandos los cambios inducidos debido a las interacciones entre los componentes de ME, los fármacos y los ligandos fueron analizados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\Delta\delta_{\text{fármaco}} = \delta_{F(ML)} - \delta_C$$

$$\Delta\delta_{\text{fármaco}} = \delta_{\text{F(ML)}} - \delta_{\text{F(M)}}$$

donde $\delta_{\text{F(ML)}}$, δ_{C} , $\delta_{\text{F(M)}}$ son los corrimientos químicos de los protones de los fármacos en los sistemas ME+ligando+fármaco [F(ML)], los correspondientes complejos con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD o MEG (C) y de los fármacos en ME libres de ligandos [F(M)], respectivamente.

$$\Delta\delta_{\text{ME}} = \delta_{\text{M(L)}} - \delta_{\text{M}}$$

$$\Delta\delta_{\text{ME}} = \delta_{\text{M(LF)}} - \delta_{\text{M(L)}}$$

donde $\delta_{\text{M(L)}}$, δ_{M} y $\delta_{\text{M(LF)}}$ son los corrimientos químicos de los protones de ME en los sistemas ME+ligando [M(L)], en las ME libres de ligando (M) en los sistemas ME+ligando+fármaco [M(LF)], respectivamente.

3.2.2.8. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD Y POTENCIAL ZETA.

El tamaño de partículas, el índice de polidispersidad y el potencial zeta de las ME estudiadas fueron determinados a 25 °C utilizando un equipo Beckman Coulter® Delsa™ Nano C Particle Analyser. La función de autocorrelación de la intensidad fue medida a un ángulo de 165° asumiendo un valor de viscosidad de 0,8878 Pa y un índice de refracción de 1,3328. Las muestras fueron apropiadamente diluidas con agua MilliQ previo a su análisis. Se evaluaron el aumento de la relación O/S en ausencia y en presencia de los fármacos, como también la incorporación de ligandos.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. MICROEMULSIONES

3.3.1.1. DIAGRAMA PSEUDO-TERNARIO DE FASES (DPF).

El diagrama pseudo-ternario de fases (DPF) describe las condiciones experimentales ideales en las cuales los componentes deben ser combinados para obtener preparaciones transparentes.⁹ El DPF obtenido a partir de los sistemas pseudo-ternarios conteniendo aceite de soja (O), FCS/EU/OS (S) y agua como fase acuosa (W) se presenta en la Figura 3.5.

Es posible observar un amplio rango de combinaciones para la obtención de microemulsiones (ME) O/W en las cuales grandes volúmenes de W y O pueden ser adicionadas manteniendo la estabilidad termodinámica del sistema. En el DPF de los sistemas en ausencia de fármaco se observa claramente la transición de separación de fases a emulsiones opacas (EM), y de EM a ME translúcidas (Figura 3.5 a). Dependiendo del contenido de O, se requiere alrededor de un 22% de W para la obtención de EM. Las ME trasparentes prevalecieron en una región en el 72% de W, alrededor de un 14 % de O.

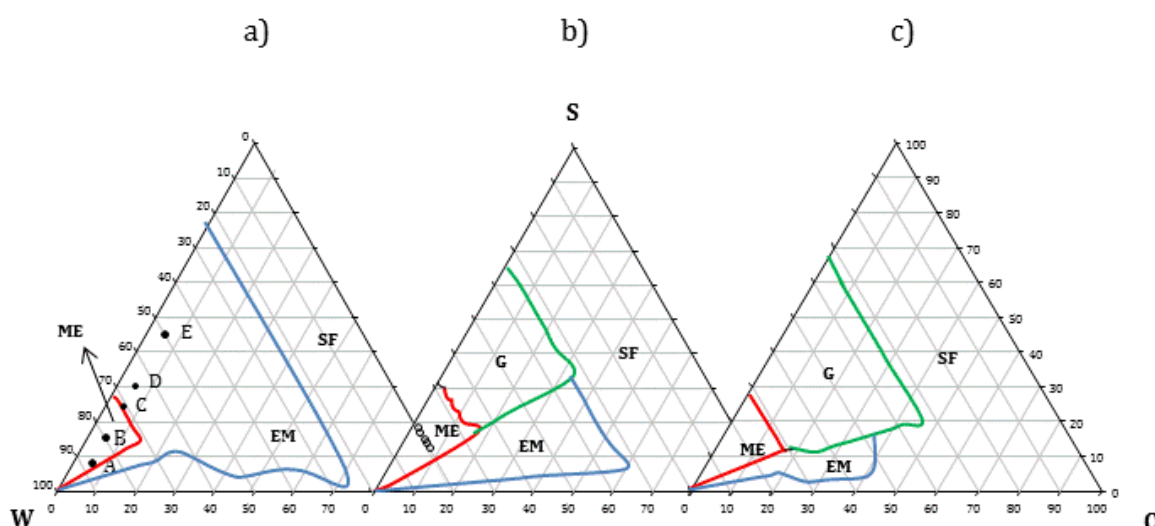


Figura 3.5. Diagrama Pseudoternario de Fases de: a) ME en ausencia de fármacos; b) ME conteniendo SMR; y c) ME conteniendo INM.

● A-E: formulaciones seleccionadas para los estudios de microscopía de luz polarizada (Tabla 3.1).

○: MEs seleccionadas para los estudios de incorporación (Tabla 3.2)

ME: microemulsión; EM: emulsión; G: gel; SF: separación de fases.

Para los sistemas conteniendo SMR o INM (Figura 3.5 b y c, respectivamente) se observó una región similar donde prevalecen las ME O/W y también se presentó una área de sistemas translucidos de mayor viscosidad designados como Geles (G). Además, se observó que la región de obtención de ME translúcidas se encontró amplificada en comparación con la de las ME en ausencia de fármacos, ya que se obtuvieron sistemas de hasta un 19% de O sugiriendo que los fármacos actúan como estabilizadores para la ME. También, se detectó

que dependiendo en el contenido de O y S se requiere al menos de un 25% de agua para la obtención de G o EM.

3.3.1.2. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP).

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de refringencia de los sistemas, se seleccionaron muestras con una concentración fija del 5% de O (Tabla 3.1 y Figura 3.5, A-E) las cuales fueron analizadas mediante microscopía de luz polarizada y las microfotografías se presentan en la Figura 3.6 para sistemas en ausencia de fármaco o conteniendo SMR o INM, respectivamente. Todas las formulaciones mostraron comportamiento no birrefringente, ya que se observaron campos oscuros en las microfotografías. El análisis de los resultados muestra que las características de transparencia no se encontraron alteradas en los sistemas en ausencia de fármacos, y que en los sistemas conteniendo SMR sólo en la más alta proporción de tensioactivo (formulación a-E y b-E) es posible sugerir que hubo modificaciones en las características estructurales de los sistemas, induciendo sistemas más organizados. Para los sistemas conteniendo INM las características de transparencia fueron independientes de la proporción de tensioactivo, siendo posible afirmar que la estructura organizacional de los sistemas permaneció inalterada. Los resultados confirmaron que las formulaciones A y B fueron sistemas organizados como nanogotículas de fase oleosa dispersas en la fase continua acuosa (ME) y las formulaciones C, D y E fueron EM o G para los sistemas en ausencia o en presencia de fármacos, respectivamente.

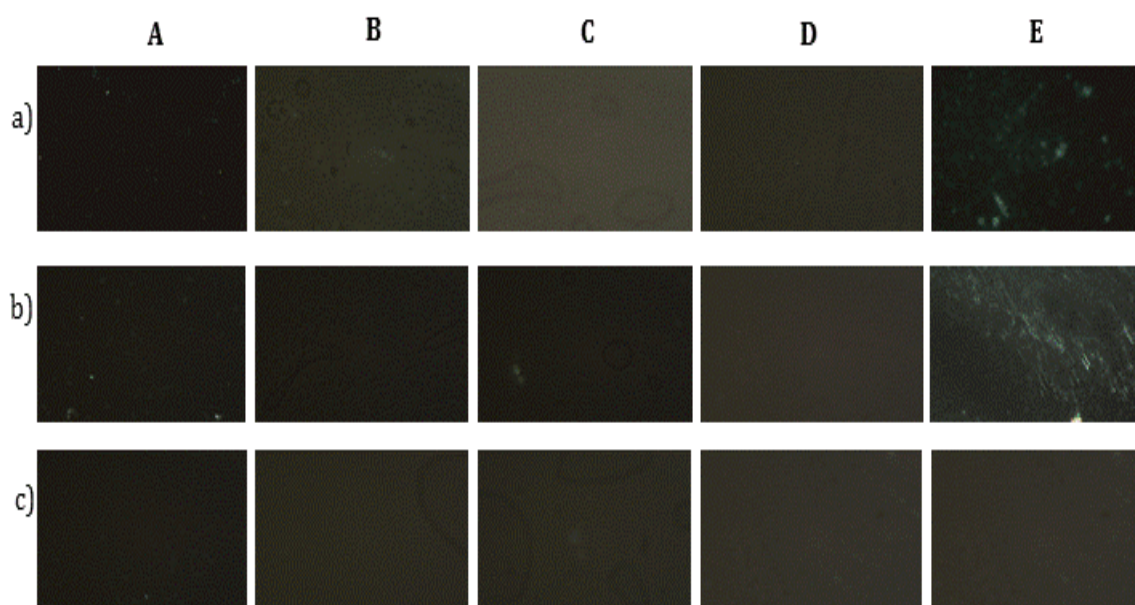


Figura 3.6. Imágenes obtenidas mediante Microscopía de Luz Polarizada de muestras seleccionadas a partir del Diagrama Pseudo-ternario de Fases (A-E) para: a) ME en ausencia de fármacos; b) ME conteniendo SMR; c) ME conteniendo INM.

3.3.1.3. CONDUCTIVIDAD (σ)

La conductividad eléctrica (σ) fue determinada en función de la composición de las microemulsiones, debido a que fue previamente demostrado que existe una fuerte correlación entre ambas.^{6,16,49,50} Se analizaron formulaciones con diferentes relaciones O/S y a lo largo de la línea C-A en la Figura 3.5, la cual representa un amplio rango de microemulsiones estables conteniendo cantidades crecientes de agua. En la Figura 3.7 puede observarse que la curva de σ en función del contenido de agua exhibe un perfil característico de conductividad percolativa, donde la conductividad disminuye tanto con el incremento del porcentaje de agua (Figura 3.7 a) como de la proporción de O (Figura 3.7 b), sugiriendo que el contenido de agua utilizado en las formulaciones se encuentra por encima de la fracción crítica, es decir, es adecuada para la obtención de estructura de ME O/W. Además, se evaluó el efecto de la presencia de los fármacos en la conductividad (Figura 3.7 c), donde no se apreciaron cambios significativos en la conductividad, sugiriendo que la microestructura interna continua en el régimen de ME aún en presencia de los IFA.

3.3.1.4. DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN (P)

La partición de los fármacos entre la fase oleosa (aceite de soja) y las diferentes fases acuosas utilizadas (agua, SRF 7,4 y SRF 8) fueron estimadas a 25 y 37 °C y se presentan en la Tabla 3.3.

Ambos fármacos presentaron valores de P menores al incrementarse el pH, indicando una menor afinidad por la fase oleosa, lo que se relaciona con el incremento en el porcentaje de las especies ionizadas de los IFA de acuerdo a los valores calculados utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Tabla 3.4).

El $C_{O/W}$ fue mayor a 25 °C, debido a la mayor solubilidad de los fármacos en la fase acuosa a 37 °C, indicando una mayor afinidad por la fase hidrofílica al incrementar la temperatura. En base a la partición y a los datos de solubilidad, puede inferirse que INM presenta una mayor afinidad por la fase lipofílica que SMR.

Tabla 3.3. Coeficientes de partición entre diferentes fases acuosas y aceite de soja realizados a 25 y 37 °C.

Temperatura	Fármaco	Fase acuosa					
		agua		SRF 7,4		SRF 8,0	
25 °C	SMR	8	± 1	2,5	± 0,3	0,26	± 0,09
	INM	809	± 152	7,5	± 0,3	3,0	± 0,3
37 °C	SMR	3,7	± 0,2	2,7	± 0,8	0,14	± 0,03
	INM	398	± 94	2,8	± 0,3	0,26	± 0,08

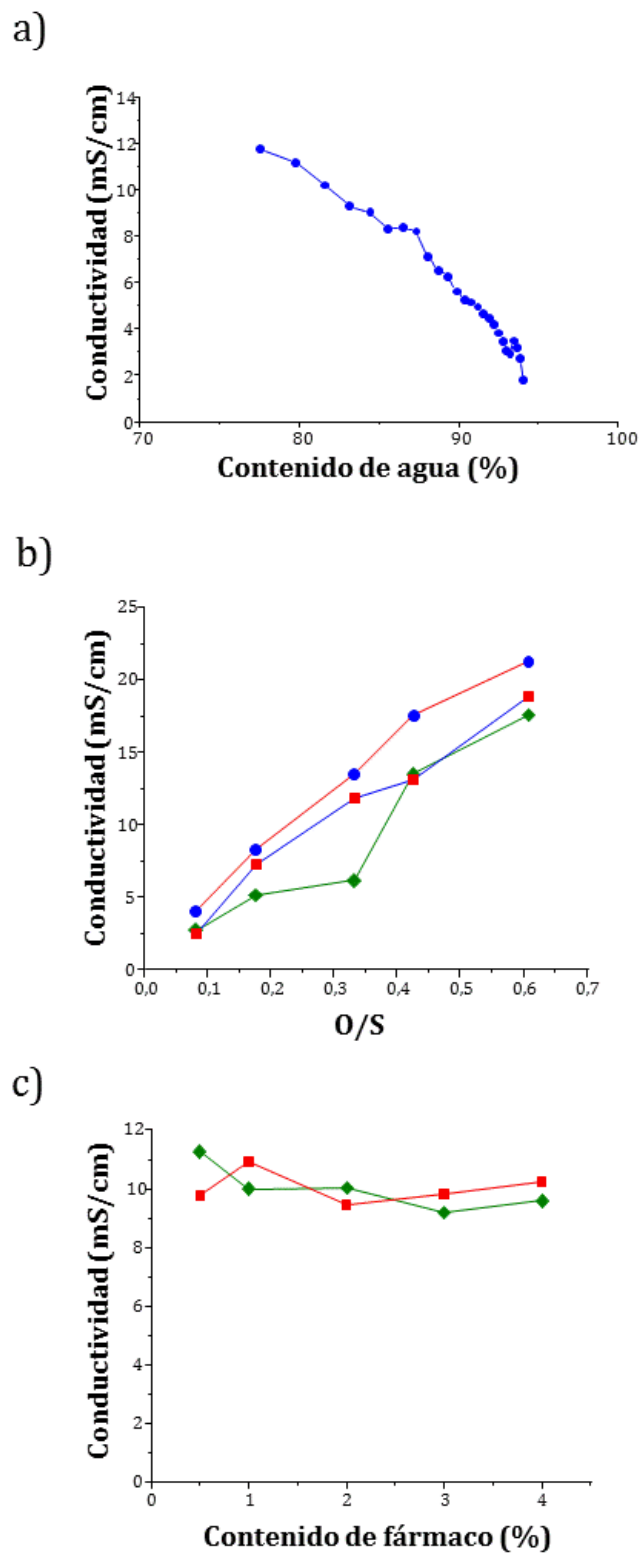


Figura 3.7. Variación de la conductividad eléctrica (σ) en función de: a) el contenido de agua (%) (a lo largo de la línea A-C del DPF, Figura 3.5); b) la relación O/S; c) el contenido de fármaco (%); para ME en ausencia de fármaco (●), conteniendo SMR (◆) o INM (■).

Tabla 3.4. Porcentajes de los fármacos ionizados y no ionizados a diferentes valores de pH calculados a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ver equilibrios de ionización de SMR e INM en Figuras 1.2 y 1.4, respectivamente).

Fase acuosa	pH	SMR				INM	
		pKa ₁ =2,6		pKa ₂ =6,9		pKa=4,5	
		[B]	[BH ⁺]	[AH]	[A ⁻]	[AH]	[A ⁻]
agua	5,5	94,78	5,22	80,22	19,78	26,89	73,11
SRF	7,4	99,18	0,82	37,75	62,25	5,22	94,78
	8,0	99,55	0,45	24,97	75,03	2,93	97,07

3.3.1.5. ESTUDIOS DE INCORPORACIÓN DE FÁRMACOS EN MICROEMULSIONES

Con el objetivo de evaluar el efecto de la relación O/S en la solubilización de los fármacos en las ME, se realizaron estudios de incorporación utilizando agua o SRF pH 8 como fase acuosa y los resultados se presentan en la Figura 3.8.

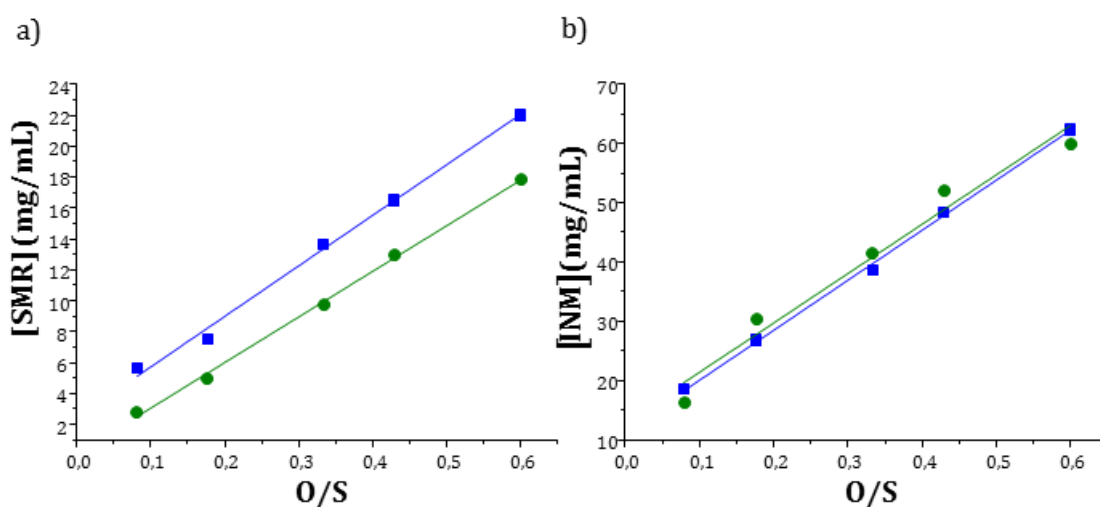


Figura 3.8. Curva de incorporación de: a) SMR e b) INM en microemulsiones O/W conteniendo agua (■) o SRF pH 8 (●) en la fase acuosa.

El experimento también fue llevado a cabo utilizando SRF pH 2 como fase acuosa, con la cual no fue posible obtener ME debido a que el grupo carboxilato de SO se encuentra en su estado neutro a este pH ($pK_a = 6,2 - 7,3$ ⁶¹), encontrándose su polaridad disminuida y la actividad tensioactiva del mismo reducida sustancialmente. En las curvas de incorporación de SMR e INM en ME con W=agua, con un volumen constante de 80%, pudo observarse un aumento lineal de la solubilidad de la droga en función de la relación O/S. Las concentraciones máximas disueltas fueron de 22,0 y 62,3 mg/mL para SMR e INM, respectivamente. Por otro lado, las concentraciones máximas incorporadas de los fármacos fueron de 16,63 y 59,91 mg/mL para SMR e INM, respectivamente, cuando se utilizó SRF pH 8 como fase acuosa. Además, los incrementos de solubilidad obtenidos fueron mayores

cuando se utilizó agua como fase acuosa (Tabla 3.5), lo que podría deberse a que ambos ingredientes activos se encuentran ionizados a pH 8, dificultando la partición de los fármacos hacia los dominios oleosos, sugiriendo que la solubilización de los fármacos dentro de las ME ocurre principalmente debido a un efecto hidrofóbico.

Tabla 3.5. Solubilidades intrínsecas de los fármacos (S_0), Solubilidades máximas ($S_{m\acute{a}x}$) e incrementos aparentes de solubilidad ($S_{m\acute{a}x}/S_0$) utilizando ME.

	Fase acuosa (W)	S_0 (mg/mL)	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	$S_{m\acute{a}x}/S_0$
SMR	Agua	0,2213	21,9879	99,38
	SRF pH 8	1,6576	16,6277	10,0312
INM	Agua	0,01824	62,3168	3416,4912
	SRF pH 8	1,4276	59,91334	41,9679

3.3.1.6. DETERMINACIÓN DEL MODO DE INTERACCIÓN FÁRMACO-COMPONENTES.

Con la finalidad de determinar la posible localización de los fármacos dentro de la dispersión coloidal, se realizaron estudio de RMN-¹H con la ME₅. Las señales de la ME fueron asignadas en base a los corrimientos químicos de los componentes puros. Las asignaciones y los corrimientos químicos de los protones de ME en ausencia y en presencia de los fármacos, y de los protones de SMR e INM se presentan en las Tablas 3.6 y 3.7, respectivamente.

Tabla 3.6. Corrimientos químicos de ME en ausencia y en presencia de fármacos.

	$\delta_{ME\ vac\acute{a}}$	$\delta_{ME\ con\ SMR}$	$\delta_{ME\ con\ SMR} - \delta_{ME\ vac\acute{a}}$	$\delta_{ME\ con\ INM}$	$\delta_{ME\ con\ INM} - \delta_{ME\ vac\acute{a}}$
H₁	0,9178	1,0297	0,1119	0,8923	-0,0255
H₂	1,3186	1,4416	0,123	1,282	-0,0366
H₃	1,5965	1,7139	0,1174	∅	X
H₄	2,0684	2,179	0,1106	2,0307	-0,0377
H₅	2,2558	2,3716	0,1158	2,2256	-0,0302
H₆	2,7988	2,9097	0,1109	2,7589	-0,0399
H₇	3,2836	3,3947	0,1111	3,1897	-0,0939
H₈	3,736	3,8531	0,1171	3,7025	-0,0335
H₉	5,3455	5,4674	0,1219	5,3932	0,0477

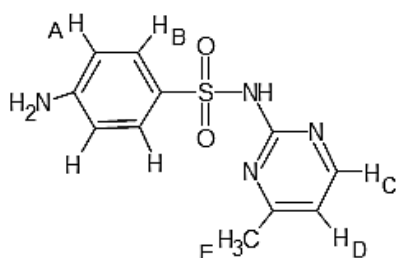
∅: señales indistinguibles debido a la superposición de señales;; x: corresponde a señal indistinguible. (Ver estructuras químicas de los componentes en Figura 3.2).

Se observaron desplazamientos hacia campos bajos, tanto para la señal correspondiente al grupo sulfonamida de SMR, como para las de los protones de las cadenas carbonadas correspondientes a los ácidos grasos. Estas observaciones indicarían la presencia de interacciones no covalentes (tipo Van Der Waals y/o hidrofóbicas), sugiriendo la ubicación de la SMR dentro de la fase oleosa de la ME. A su vez, el incremento de la

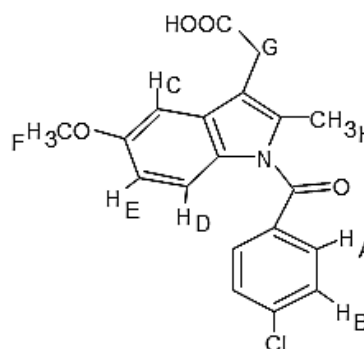
cantidad incorporada de fármaco en función de la relación O/S se condice con lo expuesto anteriormente. En el sistema INM:ME, los corrimientos hacia campos altos de protones aromáticos de INM podrían deberse a la proximidad del grupo amino de FCS, ya que los protones de éste se desplazan hacia campos bajos; así como también a las cadenas apolares, presentes en algunos de los componentes de la ME, que presentaron desplazamientos de menor magnitud. También los protones vinílicos de ácidos grasos se encuentran más desplazados hacia campos bajos, lo que podría sugerir la interacción de estos con INM. Probablemente INM estaría interaccionando con FCS mediante interacciones de tipo electrostáticas, así como con las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos mediante interacciones de tipo hidrofóbicas. Considerando el incremento de la incorporación de INM en función de la relación O/S, podríamos decir que este fármaco se ubica principalmente en la fase oleosa de la ME.

Tabla 3.7. Corrimientos químicos de SMR e INM en D₂O y en ME

SMR



INM



	δ_{SMR}	$\delta_{SMR \text{ en ME}}$	$\delta_{SMR} - \delta_{SMR \text{ en ME}}$	δ_{INM}	$\delta_{INM \text{ en ME}}$	$\delta_{INM} - \delta_{INM \text{ en ME}}$
H_A	8,1764	∅	X	7,7464	7,7499	0,0035
H_B	7,7369	7,918	0,1811	7,6335	7,4916	-0,1419
H_C	6,867	6,9364	0,0694	7,1147	7,141	0,0263
H_D	6,8091	6,5874	-0,2217	7,1006	6,7812	-0,3194
H_E	2,3921	∅	X	6,7834	6,569	-0,2144
H_F		/	/	3,902	∅	X
H_G		/	/	3,61	∅	X
H_H		/	/	2,2563	∅	X

∅: señales indistinguibles debido a la superposición de señales; /: no corresponde asignación de señal; X: corresponde a señal indistinguible.

3.3.1.7. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS (DLS) Y POTENCIAL ZETA

El tamaño de partículas y el potencial zeta de los sistemas fue determinado, obteniendo valores en el rango de 101-177 nm y (-66)-(-52) mV, respectivamente, para ME vacías y un único pico en la gráfica de distribución. El potencial zeta negativo de las ME vacías puede deberse a la presencia de OS en su forma ionizada en la interface aceite/agua ($pK_a = 6,2-7,3$ ⁶¹). En presencia de SMR e INM se registraron valores menores de tamaño de partículas, probablemente debido a la deposición de algunas moléculas de los fármacos en la interfase afectando la movilidad de los surfactantes, reduciendo de esta manera el tamaño.

Tabla 3.8. Tamaño de partículas, índice de polidispersidad (IPD) y potencial zeta de ME en ausencia de fármaco y en presencia de SMR e INM.

		<i>ME vacía</i>		
O/S	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)	
ME ₁	0,084	145 ± 1	0,247	-66,1 ± 0,4
ME ₂	0,178	150 ± 1	0,180	-52 ± 13
ME ₃	0,334	177 ± 4	0,271	-68 ± 3
ME ₄	0,428	152,6 ± 0,4	0,294	-56,0 ± 0,5
ME ₅	0,620	101 ± 6	0,279	-57 ± 9

		<i>ME con SMR</i>		
O/S	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)	
ME ₁	0,084	85,4 ± 0,6	0,241	-61 ± 2
ME ₂	0,178	115 ± 7	0,296	-51 ± 1
ME ₃	0,334	138 ± 2	0,311	-59 ± 5
ME ₄	0,428	118 ± 4	0,290	-67 ± 3
ME ₅	0,620	107 ± 3	0,300	-61 ± 2

		<i>ME con INM</i>		
O/S	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)	
ME ₁	0,084	105 ± 2	0,299	-73,2 ± 0,3
ME ₂	0,178	136 ± 7	0,250	-54 ± 1
ME ₃	0,334	160 ± 2	0,271	-72 ± 3
ME ₄	0,428	132 ± 3	0,317	-58 ± 5
ME ₅	0,620	117 ± 1	0,304	-68 ± 1

Por otro lado, la incorporación de SMR e INM no afectó significativamente el valor de potencial de superficie negativo de las ME vacías, lo que podría indicar que la mayor proporción de fármaco permanece dentro de la fase interna oleosa, ya que ambas moléculas activas se encuentran ionizadas al pH de las ME ($9,8 \pm 0,9$), lo que presentaría consistencia con los resultados obtenidos por RMN y en los estudios de incorporación. Los valores

obtenidos de tamaño de partículas y potencial zeta de las microemulsiones resultan adecuados para mantener la estabilidad de los sistemas y para el buen desempeño terapéutico de las formulaciones.

3.3.2. MICROEMULSIONES CONTENIENDO LIGANDOS

3.3.2.1. DIAGRAMA PSEUDO-TERNARIO DE FASES (DPF)

Para la caracterización de microemulsiones es necesario determinar el diagrama pseudoternario de fases que describe las condiciones experimentales en las cuales es posible obtener sistemas ópticamente transparentes.⁹ Los diagramas pseudo-ternarios de fases de los sistemas conteniendo aceite de soja (O), FCS/EU/OS (S) con diferentes fases acuosas (W) (1,8% β -CD, 12% M- β -CD, 2,5% HP- β -CD o 5% MEG en agua) fueron construidos para representar la relación entre la composición y el comportamiento de fase de las muestras y se presentaron en la Figura 3.9. La región correspondiente a la fase líquida isotrópica fue mayor tras la incorporación de los ligandos en la fase acuosa de un mínimo de 70% de W a un máximo de 16% de O a 60; 50; 50% de W y 20; 30; 35% de O con β -CD, M- β -CD y MEG, respectivamente. Esto se debe posiblemente a que los ligandos actúan como cosurfactantes, disminuyendo la tensión interfacial y produciendo la formación de fases isotrópicas, permitiendo la incorporación de mayor cantidad de W y O en la microemulsión con el mismo contenido de S. La presencia de sustancias en la fase acuosa influye en el área óptima de agrupación de las cabezas polares de los surfactantes mediante la alteración de la solubilidad acuosa de esta región de la molécula.⁶² En contraste, se observó que la región de obtención de ME fue menor tras la incorporación de HP- β -CD en W, con un mínimo de 75% de W y un máximo de 10% de O. M- β -CD y MEG fueron los cosurfactantes más apropiados para la obtención de ME en el rango estudiado, ya que el incremento en la cantidad de fase oleosa en ME puede proveer una mayor posibilidad para la dispersión de fármacos escasamente solubles en agua.⁵

3.3.2.2. CONDUCTIVIDAD (σ)

En la Sección 3.3.1, se observó que las microemulsiones en ausencia de ligandos presentaron un perfil característico de conductividad percolativa, indicando que la cantidad de agua en las formulaciones se encontraba por encima de la fracción de agua crítica necesaria para obtener ME O/W estables y se encuentran formadas por nanogotículas que existen como una fase dispersa formando dominios inmersos en la fase continua. En la presente sección, la conductividad eléctrica (σ) de ME₅ conteniendo tres concentraciones diferentes (0,005; 0,010 y 0,015 M) de cada ligando, β -CD, M- β -CD, HP- β -CD o MEG incorporados en la fase acuosa fue determinada a 25 ± 1 °C con el objetivo de caracterizar la estructura interna de los sistemas (Figura 3.10). Los valores de conductividad eléctrica de las formulaciones se encontraron dentro del rango estudiado de ME₁₋₅ (de 9,9 a 13,3 mS/cm), indicando que los sistemas en presencia de los ligandos se mantuvieron dentro del régimen de ME O/W. Además, no se observaron cambios significativos en los valores de conductividad con la variación del contenido de ligando, sugiriendo que la microestructura de la microemulsión permaneció inalterada con porcentajes crecientes de los mismos.

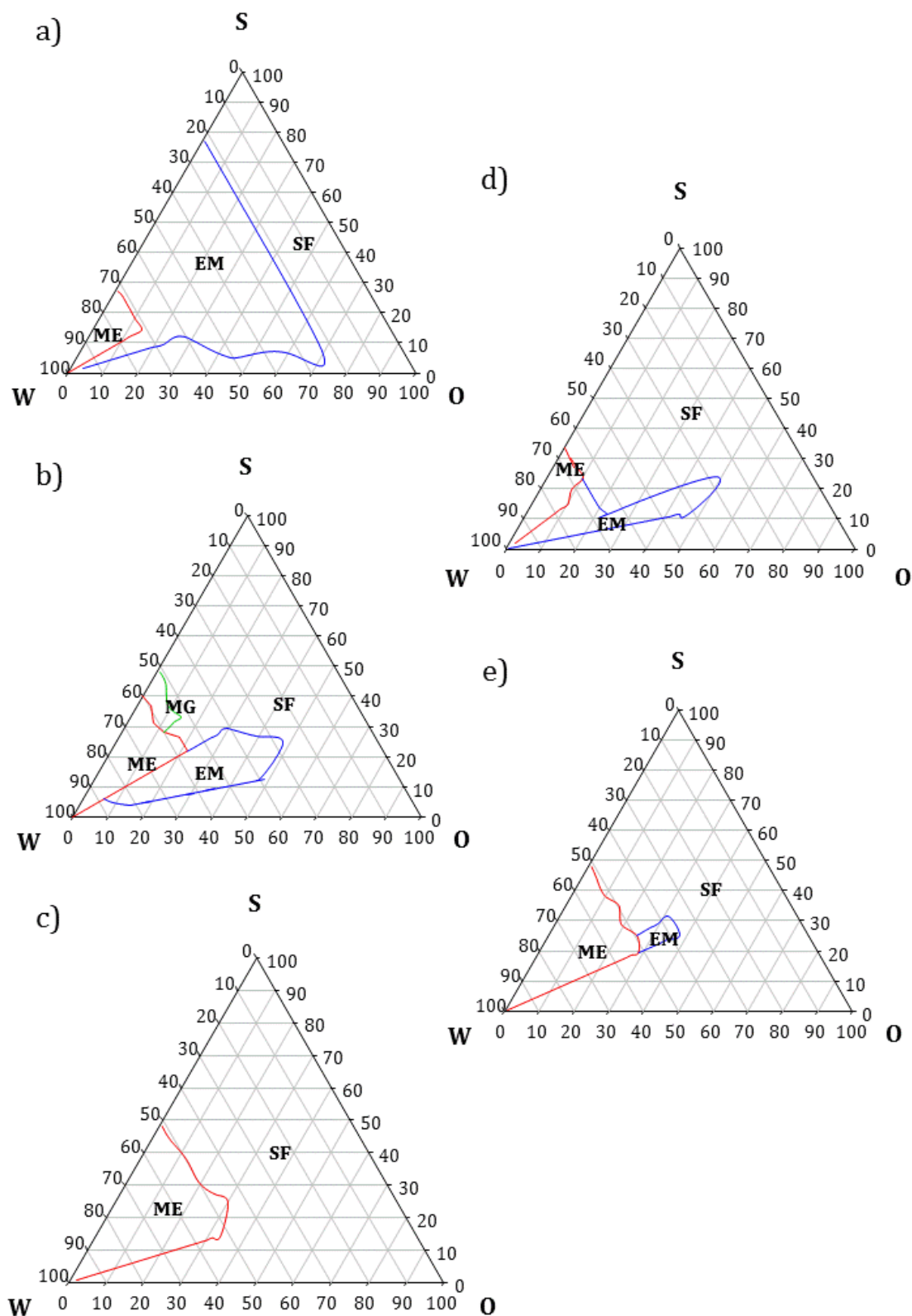


Figura 3.9. Diagrama pseudoternario de fases de ME conteniendo: a) agua; b) 1,8% β -CD; c) 12% M- β -CD; d) 2,5 % HP- β -CD o e) 5% MEG, en la fase acuosa. ME: microemulsión; EM: emulsión; G: gel; MG: microemulsión gel; SF: separación de fases.

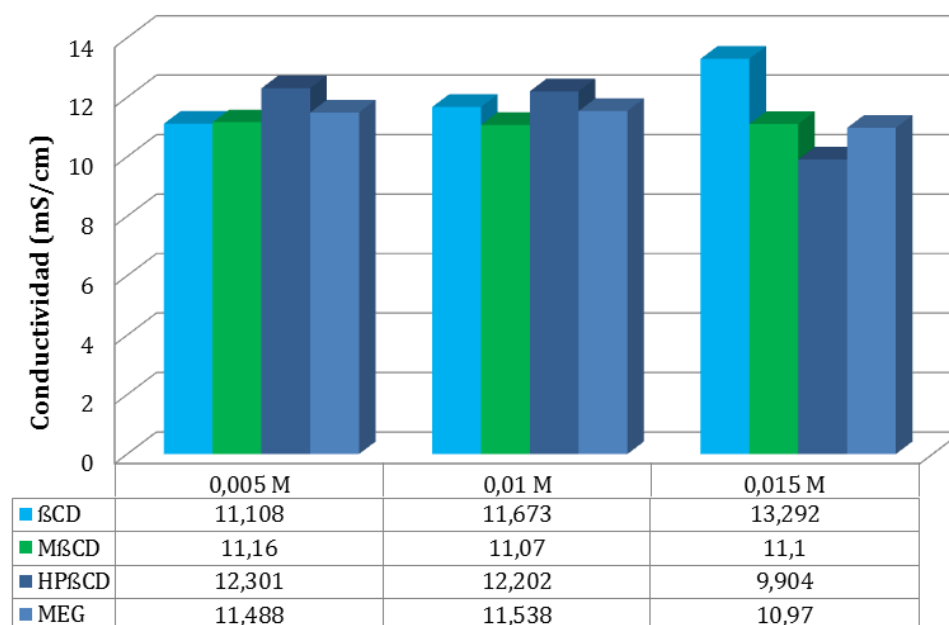


Figura 3.10. Variación en la conductividad eléctrica (σ) con el incremento de las concentraciones de los ligandos.

3.3.2.2. EFECTO DE LA PROPORCIÓN O/S EN LA SOLUBILIDAD APARENTE DE LOS FÁRMACOS DENTRO DE ME CONTENIENDO LIGANDOS

La disolución de fármacos escasamente solubles en agua mediante la vehiculización en microemulsiones puede ser favorecida mediante la incorporación CD y MEG en los sistemas. Con el objetivo de evaluar el efecto de los ligandos sobre la disolución de SMR e INM en ME, se seleccionaron muestras conteniendo diferentes proporciones O/S y con diferente contenido de la fase acuosa (en ausencia de ligando; 1,8% β -CD; 12% M- β -CD; 2,5% HP- β -CD o 5% MEG en agua o en SRF 8) y la curva de O/S en función de la concentración de fármaco fue graficada y se presenta en la Figura 3.11. Las solubilidades de los IFA en las fases acuosas (S_w), las solubilidades máximas ($S_{m\acute{a}x}$), el incremento de solubilidad aparente ($S_{m\acute{a}x}/S_0$ o $S_{m\acute{a}x}/S_w$) y las constantes de estabilidad (K_C) fueron determinadas y se presentan en la Tabla 3.9.

Del mismo modo que fue reportado para las ME₁₋₅ en ausencia de ligandos en la Sección 3.3.1, se observó un crecimiento lineal en la concentración de los fármacos incorporados en función de proporciones O/S crecientes. Si bien los mayores valores de $S_{m\acute{a}x}$ de SMR e INM fueron obtenidos con las ME con W=5% MEG (35,6 mg/mL) y W=1,8% β -CD en SRF 8 (73,1 mg/mL), respectivamente, el mayor valor de $S_{m\acute{a}x}/S_w$ fue obtenido con W=agua, el cual presentó el mayor valor de K_C y el mayor $S_{m\acute{a}x}/S_0$ fue obtenido con W=5% MEG en agua y con la ME con W=agua, respectivamente. La contribución de MEG para el aumento de la solubilización de SMR puede ser explicado en términos del incremento en la concentración del fármaco solubilizado en la fase acuosa.

Tabla 3.9. Solubilidades de los fármacos en la fase acuosa (S_w), solubilidades máximas ($S_{m\acute{a}x}$), incrementos aparentes de solubilidad utilizando las ME ($S_{m\acute{a}x}/S_0$ o $S_{m\acute{a}x}/S_w$) y constantes de estabilidad (K_c).

		Sulfamerazina				
Fase acuosa (W)		S_w (mg/mL)	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	$S_{m\acute{a}x}/S_w$	$S_{m\acute{a}x}/S_0$	K_c (M^{-1})
Agua (S_0)		0,2213	21,9879	99,36	99,36	167,55
SRF pH 8 (S_0)		1,6576	16,6277	10,03	10,03	17,72
β -CD 1,8% en agua		0,83	17,30	20,84	78,17	31,37
β -CD 1,8% en SRF pH 8		3,768	20,18	5,36	12,17	11,21
M- β -CD 1,8% en agua		2,2	9,62	4,37	43,47	2,15
M- β -CD 1,8% en SRF pH 8		8,1	12,24	1,51	7,39	2,48
HP- β -CD 2,5% en agua		0,69	22,53	32,65	101,80	101,8
HP- β -CD 2,5% en SRF pH 8		1,9	26,39	13,89	15,92	15,92
MEG 5% en agua		46,8	32,36	0,69	146,25	0,2359
MEG 5% en SRF pH 8		54,8	35,96	0,66	21,69	0,5741

		Indometacina				
Fase acuosa (W)		S_0 (mg/mL)	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	$S_{m\acute{a}x}/S_w$	$S_{m\acute{a}x}/S_0$	K_c (M^{-1})
Agua (S_0)		0,02	67,01	302,80	302,80	6771,83
SRF pH 8 (S_0)		1,43	59,91	36,14	36,14	64,65
β -CD 1,8% en agua		0,04	65,26	1652,08	294,88	3706,39
β -CD 1,8% en SRF pH 8		5,86	73,11	12,48	44,11	15,02
M- β -CD 1,8% en agua		0,11	25,77	241,95	116,44	297,65
M- β -CD 1,8% en SRF pH 8		14,65	36,77	2,51	22,18	3,67
HP- β -CD 2,5% en agua		17,71	64,99	3,67	293,65	175,33
HP- β -CD 2,5% en SRF pH 8		76,34	62,06	0,81	37,44	43,47

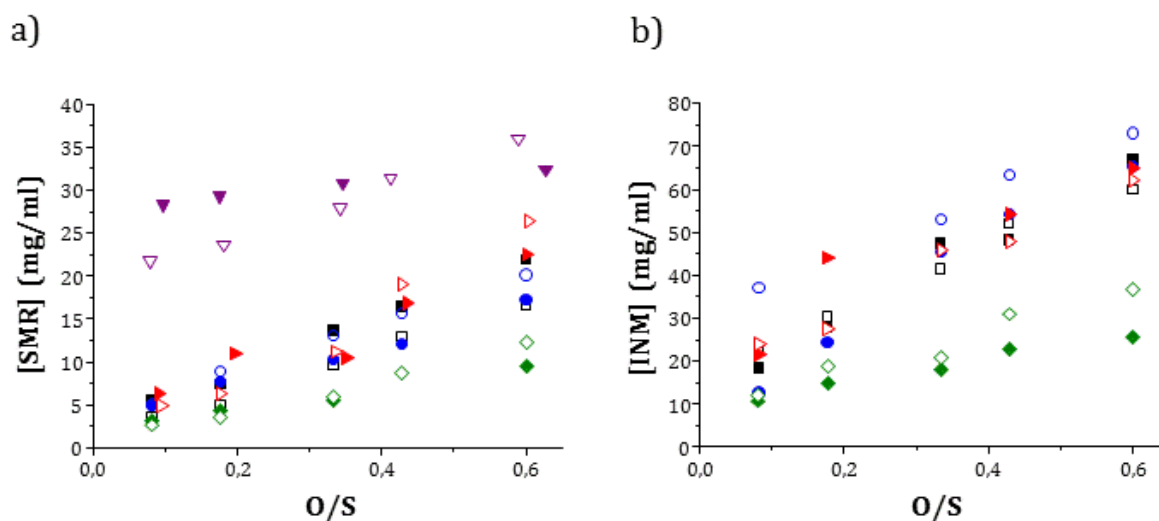
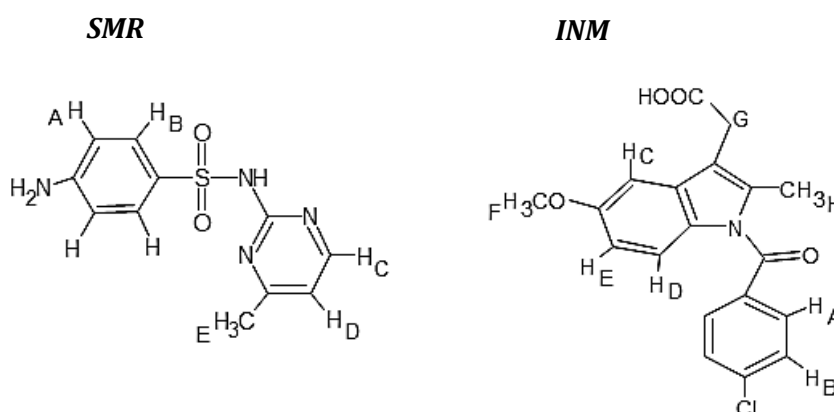


Figura 3.11. Curvas de incorporación de: a) SMR e b) INM en microemulsiones en ausencia de ligando (■) o conteniendo 1,8% β -CD (●), 12% M- β -CD (◆), 2,5 % HP- β -CD (▶) o 5% MEG (▼) en agua (figura vacía) o en SRF pH 8 (figura llena), como fase acuosa.

3.3.2.3. DETERMINACIÓN DEL MODO DE INTERACCIÓN FÁRMACO-COMPONENTES.

Las interacciones intermoleculares entre los fármacos y los componentes de ME fueron investigadas mediante RMN-¹H para esclarecer la ubicación de las moléculas de SMR e INM dentro de los sistemas. Los espectros de ME₅ vacía y conteniendo los fármacos con diferentes contenidos de la fase acuosa (agua; 1,8% β-CD; 12% M-β-CD; 2,5% HP-β-CD o 5% MEG en agua) fueron obtenidos mediante la apropiada dilución de las muestras en D₂O. Los desplazamientos químicos de SMR e INM incorporados en los sistemas ME+ligando+fármaco ($\delta_{F(ML)}$) con respecto a los correspondientes complejos con β-CD, M-β-CD, HP-β-CD o MEG (δ_C) y con los fármacos en las ME en ausencia de ligandos ($\delta_{F(M)}$) fueron obtenidos y se presentan en la Tabla 3.10. Por otro lado, los desplazamientos de las señales de ME dentro de los sistemas ME+Ligando ($\delta_{M(L)}$) con respecto a la ME en ausencia de ligando y fármaco (δ_M) y en el sistemas ME+Ligando conteniendo el fármaco ($\delta_{M(LF)}$) con respecto al sistema ME+Ligando fueron analizados y son expuestos en la Tabla 3.11.

Tabla 3.10. Desplazamientos químicos de SMR e INM incorporados en los sistemas ME + ligando ($\delta_{F(ML)}$) con respecto al correspondiente complejo con β-CD, M-β-CD, HP-β-CD o MEG (δ_C) y al fármaco en la ME libre de ligando ($\delta_{F(M)}$).



	SMR:βCD		SMR:MβCD		SMR:HPβCD		SMR:MEG	
	$\delta_{F(ML)} - \delta_C$	$\delta_{F(ML)} - \delta_{F(M)}$	$\delta_{F(ML)} - \delta_C$	$\delta_{F(ML)} - \delta_{F(M)}$	$\delta_{F(ML)} - \delta_C$	$\delta_{F(ML)} - \delta_{F(M)}$	$\delta_{F(ML)} - \delta_C$	$\delta_{F(ML)} - \delta_{F(M)}$
A	-0,2541	∅	-0,1705	∅	-0,1930	∅	0,0065	∅
B	-0,1331	-0,2543	-0,0115	-0,1765	-0,0789	-0,2426	0,0232	-0,1394
C	-0,1666	-0,1559	-0,1207	-0,1122	-0,0784	-0,1216	0,0091	-0,1491
D	-0,1698	0,075	0,1216	0,1768	-0,1396	0,0765	-0,0296	-0,2147

	INM:βCD		INM:MβCD		INM:HPβCD	
	$\delta_{F(ML)} - \delta_C$	$\delta_{F(ML)} - \delta_{F(M)}$	$\delta_{F(ML)} - \delta_C$	$\delta_{F(ML)} - \delta_{F(M)}$	$\delta_{F(ML)} - \delta_C$	$\delta_{F(ML)} - \delta_{F(M)}$
A	-0,0539	-0,0709	-0,0111	-0,061	-0,0571	-0,0015
B	-0,1915	-0,0572	-0,1176	-0,0312	-0,2300	0,0319
C	-0,4259	-0,0489	-0,3664	-0,043	-0,2846	-0,0281
D	-0,3976	-0,0234	-0,2587	0,0884	-0,2978	0,0884
E	-0,4081	-0,0313	-0,2962	0,0406	-0,2895	0,0644

∅: señal indistinguible

En la ME vacía conteniendo 1,8% β -CD, se observaron desplazamientos hacia campos bajos para las señales correspondientes al grupo éster de EU y para la correspondiente al grupo metileno próximo al ácido carboxílico de OS, sugiriendo la presencia de β -CD en la proximidad de las moléculas de surfactantes. En las ME con SMR conteniendo 1,8% β -CD, se registraron desplazamientos hacia campos altos respecto a ME: β -CD, SMR:ME y SMR: β -CD para la mayoría de las señales de ME y SMR, lo que podría indicar la presencia de interacciones de tipo Van Der Waals o hidrofóbicas entre el fármaco, la CD y los componentes de la ME. Los mayores desplazamientos fueron observados para las señales de FCS y EU, sugiriendo la interacción de SMR con los surfactantes en la interfase, lo que podría estar relacionado a la mejor disolución de SMR en las ME conteniendo β -CD con respecto a las ME en ausencia de ligandos. En la ME vacía conteniendo 12% M- β -CD; 2,5% HP- β -CD y %5 MEG se observaron desplazamientos hacia campos altos más significativo fue registrado para los protones vecinales al enlace vinílico y los protones vinílicos de ácidos grasos, lo que podría indicar la interacción de estos ligandos con OS, FCS y las cadenas laterales de ácidos grasos. En la ME con SMR conteniendo 12% M- β -CD los desplazamientos hacia campos altos más significativos fueron observados para los protones vecinales al enlace vinílico y los desplazamientos hacia campos bajos más significativos fueron observados para los protones vinílicos y para los grupos metilenos de las cadenas carbonadas de ácidos grasos. La ME con SMR conteniendo 2,5% HP- β -CD presentó los mayores desplazamientos hacia campos bajos para los protones vinílicos y los grupos metilenos de las cadenas carbonadas de ácidos grasos y para las señales correspondientes a los grupos metilenos de las cadenas laterales de EU y los grupos metilenos próximos al ácido carboxílico de OS, sugiriendo la presencia de HP- β -CD en la proximidad de las moléculas de surfactantes. En las ME con SMR conteniendo 5% MEG presentó desplazamientos hacia campos altos de las señales de FCS, OS y EU lo que podría deberse al efecto de apantallamiento del grupo amino de MEG, y los protones de SMR presentaron desplazamientos hacia campos altos respecto a SMR:ME sugiriendo la interacción con MEG. Todos los protones de SMR presentaron desplazamientos hacia campos altos en todas las ME, indicando la presencia de interacción con grupos donores de electrones como las cadenas laterales de ácidos grasos.

En la ME con INM conteniendo 1,8% β -CD se observaron desplazamientos hacia campos altos para la mayoría de los protones de ME, siendo los más significativos los de FCS, EU y los grupos metilenos de las cadenas laterales de ácidos grasos y todos los protones de INM presentaron desplazamientos hacia campos altos, indicando la presencia de interacción con grupos funcionales donores de electrones como las cadenas laterales de ácidos grasos. Esto podría indicar la interacción de INM tanto con los surfactantes como con la fase oleosa, lo que presenta consistencia con la mayor disolución de INM cuando fue incorporada en la ME conteniendo 1,8% β -CD. En las ME con INM conteniendo 12% M- β -CD, la mayoría de los protones de ME presentaron desplazamientos hacia campos bajos, siendo los más significativos los correspondientes a los protones vecinales al ácido carboxílico y a los grupos metilenos de las cadenas laterales de ácidos grasos, sugiriendo así la incorporación de INM principalmente en el dominio oleoso dentro de este sistema. En las ME con INM conteniendo 2,5% HP- β -CD, los desplazamientos más significativos fueron registrados para FCS y para las señales de los grupos metilenos de las cadenas laterales de ácidos grasos. En las ME conteniendo M- β -CD e HP- β -CD se registraron desplazamientos

hacia campos altos para los protones H_A, H_B y H_C de INM los cuáles se encuentran con mayor densidad electrónica lo que les confiere mayor afinidad por grupos donores de electrones como los de las cadenas laterales de ácidos grasos. Por otro lado, se observaron desplazamientos hacia campos bajos para los protones H_D y H_E de INM los cuales presentan menos densidad electrónica lo que les confiere mayor afinidad por grupos aceptores de electrones, como el grupo ácido carboxílico de ácidos grasos o el grupo amino de FCS. Estos resultados sugieren la interacción de INM tanto con los surfactantes cuanto con la fase oleosa de ME conteniendo M-β-CD o HP-β-CD.

Tabla 3.11. Desplazamientos químicos de las señales de ME incorporadas en los sistemas ME+ligando ($\delta_{M(L)}$) con respecto a la ME libre de ligando (δ_M) y de los sistema ME+Ligando+fármaco ($\delta_{M(LF)}$) con respecto al sistema ME+ligando.

	ME+βCD		ME+MβCD		ME+HPβCD		ME+MEG	
	$\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(L)}-\delta_M$	$\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(L)}-\delta_M$	$\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(L)}-\delta_M$	$\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(L)}-\delta_M$
H₁	0,9616	0,0438	0,8913	-0,0265	0,9126	-0,0052	0,8870	-0,0308
H₂	1,3645	0,0459	1,3001	-0,0185	1,3225	0,0039	1,2953	-0,0233
H₃	1,6439	0,0474	1,5748	-0,0217	1,5932	-0,0033	1,5697	-0,0268
H₄	2,1117	0,0433	2,0372	-0,0312	2,0650	-0,0034	2,0419	-0,0265
H₅	2,3131	0,0573	2,2383	-0,0175	2,2584	0,0026	2,2333	-0,0225
H₆	2,8199	0,0211	2,7543	-0,0445	2,7611	-0,0377	2,7502	-0,0486
H₇	3,3267	0,0431	3,2569	-0,0267	3,2715	-0,0121	3,2543	-0,0293
H₈	3,7916	0,0556	3,7128	-0,0232	3,7279	-0,0081	3,7070	-0,0290
H₉	5,3799	0,0344	5,3143	-0,0312	5,3288	-0,0167	5,3090	-0,0365

	SMR+ME+βCD		SMR+ME+MβCD		SMR+ME+HPβCD		SMR+ME+MEG	
	$\delta_{M(LF)}$	$\delta_{M(LF)}-\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(LF)}$	$\delta_{M(LF)}-\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(F)}$	$\delta_{M(LF)}-\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(LF)}$	$\delta_{M(LF)}-\delta_{M(L)}$
H₁	0,8751	-0,0865	0,9087	0,0174	0,9736	0,0610	0,8709	-0,0161
H₂	1,2785	-0,086	1,3040	0,0039	1,3028	-0,0197	1,2778	-0,0175
H₃	1,5639	-0,08	1,5849	0,0101	1,5759	-0,0173	1,5633	-0,0064
H₄	2,0294	-0,0823	2,0615	0,0243	2,0520	-0,0130	2,0273	-0,0146
H₅	2,228	-0,0851	2,2437	0,0054	2,2343	-0,0241	2,2201	-0,0132
H₆	2,7431	-0,0768	2,3405	-0,4138	2,7527	-0,0084	2,7411	-0,0091
H₇	3,2334	-0,0933	3,2627	0,0058	3,2640	-0,0075	3,2338	-0,0205
H₈	3,6995	-0,0921	3,7200	0,0072	3,7122	-0,0157	3,6906	-0,0164
H₉	5,2938	-0,0861	5,3253	0,0110	5,3162	-0,0126	5,2968	-0,0122

	INM+ME+βCD		INM+ME+MβCD		INM+ME+HPβCD	
	$\delta_{M(LD)}$	$\delta_{M(LD)}-\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(LD)}$	$\delta_{M(LD)}-\delta_{M(L)}$	$\delta_{M(LD)}$	$\delta_{M(LD)}-\delta_{M(L)}$
H₁	0,8830	-0,0786	0,8996	0,0083	0,8980	-0,0146
H₂	1,2827	-0,0818	1,2962	-0,0039	1,3005	-0,0220
H₃	1,5708	-0,0731	1,5961	0,0213	1,5715	-0,0217
H₄	2,0262	-0,0855	2,0508	0,0136	2,0282	-0,0368
H₅	2,2370	-0,0761	2,2636	0,0253	2,2449	-0,0135
H₆	2,7512	-0,0687	2,7763	0,0220	2,7481	-0,0130
H₇	3,1602	-0,1665	3,1729	-0,0840	3,2436	-0,0279
H₈	3,6991	-0,0926	3,7148	0,0020	3,7158	-0,0121
H₉	5,2980	-0,0819	5,3397	0,0254	5,3182	-0,0106

3.3.2.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS, POLIDISPERSIDAD Y POTENCIAL ZETA

El tamaño de partículas, polidispersidad y potencial zeta fue determinado a 25 °C tanto para las ME vacías como para las ME con los fármacos con diferentes composiciones de la fase acuosa (agua; 1,8% β -CD; 12% M- β -CD; 2,5% HP- β -CD o 5% MEG en agua). Todas las muestras presentaron un único pico en la gráfica de distribución y los principales resultados se encuentran resumidos en la Tabla 3.12.

Se registró una disminución en los valores de tamaño de partículas (20,9 - 73 nm) debido a la presencia de los ligandos para las ME conteniendo los fármacos, probablemente a causa de la deposición de algunas moléculas de fármacos y ligandos en la interfase afectando la movilidad de los surfactantes y reduciendo así el tamaño. Esto presentó consistencia con los resultados obtenidos mediante RMN que indicaron la existencia de interacción de los ligandos y de los fármacos con los surfactantes.

Tabla 3.12. *Tamaño de partículas, índice de polidispersidad (IPD) y potencial zeta de ME conteniendo ligandos en ausencia de fármaco y en presencia de SMR e INM.*

<i>ME en ausencia de fármacos</i>					
	Tamaño (nm)		IPD	Potencial Zeta (mV)	
ME₅	97	± 6	0,279	-57	± 9
ME₅ + β-CD	103	± 4	0,423	-41	± 7
ME₅ + M-β-CD	150	± 2	0,380	-0,88	± 0,06
ME₅ + HP-β-CD	183	± 12	0,316	-61	± 4
ME₅ + MEG	96	± 3	0,295	-0,6	± 0,3
<i>ME con SMR</i>					
	Tamaño (nm)		IPD	Potencial Zeta (mV)	
ME₅	107	± 3	0,300	-57	± 9
ME₅ + β-CD	21	± 1	0,298	-0,18	± 0,04
ME₅ + M-β-CD	42	± 6	0,391	-10	± 3
ME₅ + HP-β-CD	43	± 6	0,259	-15,5	± 0,3
ME₅ + MEG	21	± 1	0,300	-0,14	± 0,05
<i>ME con INM</i>					
	Tamaño (nm)		IPD	Potencial Zeta (mV)	
ME₅	117	± 1	0,304	-68	± 2
ME₅ + β-CD	73	± 4	0,206	-0,2	± 0,3
ME₅ + M-β-CD	48	± 6	0,569	0,34	± 0,05
ME₅ + HP-β-CD	24	± 2	0,290	-2,6	± 0,6

Del mismo modo previamente expuesto para las ME₁₋₅ en la Sección 3.3.1, el valor de potencial de superficie negativo de las gotículas de las ME en ausencia de fármacos fue

debido a la presencia de SO en su forma ionizada en la interfase aceite/agua ($pK_a=6,2-7,3^{61}$). Para las ME conteniendo ligandos los valores de potencial zeta fueron cercanos a cero, lo que puede explicarse mediante la interacción de los ligandos con el OS y con los fármacos con carga negativa mediante interacciones electrostáticas con el grupo amino de MEG o mediante formación de complejos con CD contribuyendo así a la neutralización.

3.4. CONCLUSIONES PARCIALES

A partir de los resultados obtenidos, se pudo demostrar que los sistemas microemulsionados pueden ser obtenidos mediante un procedimiento simple y a partir de componentes altamente biocompatibles. En los diagramas pseudo-ternarios de fases, tanto para los sistemas en ausencia como en presencia de fármacos, fueron observadas amplias regiones isotrópicas, lo que fue confirmado por microscopía de luz polarizada. Las determinaciones de conductividad indicaron que es posible obtener ME O/W estables en un amplio rango de proporciones de los componentes y sugirieron que la microestructura interna se encuentra representada por gotículas de fase oleosa dispersas formando dominios que permanecen inalterados debido a la incorporación de los fármacos. Los estudios de RMN mostraron que tanto SMR como INM fueron incorporados dentro de los dominios oleosos de las ME. Las ME obtenidas presentaron tamaños de partículas de alrededor de 100 nm y presentaron carga de superficie negativa. Las formulaciones fueron capaces de incorporar concentraciones apreciables de SMR e INM.

Por otro lado, el presente capítulo reflejó las ventajas de la estrategia de combinación de CD y MEG con ME. El diagrama pseudo-ternario de fases demostró que tras la adición de β -CD, M- β -CD o MEG a la fase acuosa del sistema puede obtenerse una región isotrópica mayor de ME confirmando la posibilidad de dispersar mayores concentraciones de los fármacos lipofílicos. Los estudios de conductividad indicaron que estos sistemas permanecen en el régimen de ME O/W y se encuentran formados por nanogotículas oleosas dispersas formando dominios en la fase continua, y que la estructura del sistema permaneció inalterada tras la incorporación de los ligandos. Cantidades apreciables de SMR e INM fueron disueltas con todas las ME conteniendo ligandos, obteniéndose las mayores concentraciones con ME con W=5% MEG (35,6 mg/mL) y W=1,8% β -CD en SRF 8 (73,1 mg/mL) para SMR e INM, respectivamente. Mediante estudios de NMR pudo revelarse que β -CD, M- β -CD, HP- β -CD, MEG, SMR e INM interactúan tanto con los surfactantes como con la fase oleosa de los sistemas. Se registraron tamaños de partículas reducidos (20,9 - 73 nm) en presencia de ligandos para las ME conteniendo fármacos.

Los sistemas demostraron ser una herramienta exitosa para la vehiculización de SMR e INM, y los resultados podrían aportar datos para otros fármacos de grado similar de hidrofiliidad-lipofiliidad.

3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Graf A, Ablinger E, Peters S, Zimmer A, Hook S, Rades T. Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants : Nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. *Int J Pharm* 2007;350:351–60.
2. Liu C-H, Chang F-Y, Iu CL, Hang FC. Development and characterization of eucalyptol microemulsions for topic delivery of curcumin. *Chem Pharm Bull* 2011;59:172–8.
3. Djekic L, Primorac M. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *Int J Pharm* 2008;352:231–9.
4. Lv F-F, Li N, Zheng L-Q, Tung C-H. Studies on the stability of the chloramphenicol in the microemulsion free of alcohols. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;62:288–94.
5. Fu X, Feng F, Huang B. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for antimicrobial activity of glycerol monolaurate. *Int J Pharm* 2006;321:171–5.
6. Mehta SK, Kaur G, Bhasin KK. Tween-Embedded Microemulsions—Physicochemical and Spectroscopic Analysis for Antitubercular Drugs. *AAPS Pharm Sci Tech* 2009;11:143–53.
7. Winsor PA. Hydrotrophy, solubilization and related emulsification processes. *Trans Faraday Soc* 1948;44:376–98.
8. Constantinides PP, Scalart J-P. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides. *Int J Pharm* 1997;158:57–68.
9. Formariz TP, Sarmiento VH V, Silva-Junior AA, Scarpa M V, Santilli C V, Oliveira AG. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2006;51:54–61.
10. Li H-L, Zhang Z-Y, Ma L-L, Chen X-Y. Preparation of tanshinone microemulsion and its absorption in rat intestine in situ. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2007;32:1024–7.
11. Lu B, Zhang Z-Q. Application of triangular phase diagrams to investigate the formulation conditions of pharmaceutical microemulsions. *Yaoxue Xuebao* 2001;36:61–2.
12. Dalmora MEA, Oliveira AG, Dalmora SL. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and *in vivo* topical anti-inflammatory effect. *Int J Pharm* 2001;222:45–55.
13. Li G, Fan Y, Li X, Wang X, Li Y, Liu Y, et al. In vitro and *in vivo* evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. *Int J Pharm* 2012;425:53–61.
14. Taylor P, Fanun M. Solubilization of Azithromycin in Microemulsions Based on Mixed Nonionic Surfactants and Mixed Oils Solubilization of Azithromycin in Microemulsions Based on Mixed Nonionic Surfactants and Mixed Oils. *JDisper Sci Technol* 2012;33:185–90.
15. Tian Q, Ren F, Xu Z, Xie Y, Zhang S. Preparation of high solubilizable microemulsion of naproxen and its solubilization mechanism. *Int J Pharm* 2012;426:202–10.

16. Hathout RM, Woodman TJ, Mansour S, Mortada ND, Geneidi AS, Guy RH. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. *Eur J Pharm Sci* 2010;40:188–96.
17. Padula C, Nicoli S, Santi P. Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin. *Int J Pharm* 2009;372:12–6.
18. Zhang J, Michniak-kohn B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs : Ketoprofen , lidocaine , and caffeine. *Int J Pharm* 2008;421:34–44.
19. Cecutti C, Rico I, Lattes A, Novelli A, Rico A, Marion G, et al. New formulation of blood substitutes: optimization of novel fluorinated microemulsions. *Eur J Med Chem* 1989;24:485–92.
20. Djekic L, Primorac M, Filipic S, Agbaba D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. *Int J Pharm* 2012;433:25–33.
21. Formariz TP, Chiavacci LA, Scarpa M V, Silva-Júnior AA, Egito EST, Terrugi CHB, et al. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2010;77:47–53.
22. Nornoo AO, Chow DS-L. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel: II. Stability, *in vitro* release and pharmacokinetics. *Int J Pharm* 2008;349:117–23.
23. Silva AE, Barratt G, Chéron M, Egito EST. Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. *Int J Pharm* 2013;454:641–8.
24. Margulis-goshen K, Kesselman E, Danino D, Magdassi S. Formation of celecoxib nanoparticles from volatile microemulsions. *Int J Pharm* 2010;393:230–7.
25. Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM, Sarmento VH V, Chiavacci LA, Scarpa M V, et al. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2008;66:253–9.
26. Goddeeris C, Cuppo F, Reynaers H, Bouwman WG, Mooter G Van Den, Van den Mooter G. Light scattering measurements on microemulsions: Estimation of droplet sizes. *Int J Pharm* 2004;312:187–95.
27. Carrie L. Zachar. Pharmaceutically Relevant Microemulsions with Potential Topical, Ophthalmic, and Parenteral Applications. *Pharm. Relev. PhD Thesis.* 2010;
28. Eros G, Kurgyis Z, Németh IB, Csizmazia E, Berkó S, Szabó-Révész P, et al. The irritant effects of pharmaceutically applied surfactants. *J Surfactants Deterg* 2014;17:67–70.
29. Uematsu M, Kumagami T, Shimoda K, Kusano M, M T, H T. Polyoxyethylene hydrogenated castor oil modulates benzalkonium chloride toxicity: Comparison of acute corneal barrier dysfunction induced by travoprost z and travoprost. *J Ocul Pharmacol Ther* 2011;27:437–44.
30. Djekic L, Primorac M, Jockovic J. Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic microemulsions. *J mol liq* 2011;160.
31. Gani SSA, Basri M, Rahman MBA, Kassim A, Rahman RNZRA, Salleh AB, et al. Engkabang fat esters for cosmeceutical formulation. *J Surfactants Deterg* 2011;14:227–33.

32. Ali SM, Asmat F, Maheshwari A, Mashhood Ali S. NMR spectroscopy of inclusion complex of D-(-)-chloramphenicol with β -cyclodextrin in aqueous solution. *Farm* 2004;59:835–8.
33. Jansook P, Loftsson T. CD as solubilizers: Effects of excipients and competing drugs. *Int J Pharm* 2009;379:32–40.
34. Iohara D, Hirayama F, Ishiguro T. Preparation of amorphous indomethacin from aqueous 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin solution. *Int J Pharm* 2007;354:70–6.
35. Yang B, Lin J, Chen Y, Liu Y. Artemether/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host–guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode. *Bioorg Med Chem* 2009;17:6311–7.
36. Brewster ME, Vandecruys R, Peeters J, Neeskens P, Verreck G, Loftsson T. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. *Eur J Pharm Sci* 2008;34:94–103.
37. George SJ, Vasudevan DT. Studies on the Preparation, Characterization, and Solubility of 2-HP- β -Cyclodextrin-Mecizine HCl Inclusion Complexes. *J Young Pharm* 2012;4:220–7.
38. Mishur RJ, Griffin ME, Battle CH, Shan B, Jayawickramarajah J. Molecular recognition and enhancement of aqueous solubility and bioactivity of CD437 by β -cyclodextrin. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:857–60.
39. Garnero C, Longhi M. Study of ascorbic acid interaction with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triethanolamine, separately and in combination. *J Pharm Biomed* 2007;45:536–45.
40. Anselmi C, Centini M, Maggiore M, Gaggelli N, Andreassi M, Buonocore A, et al. Non-covalent inclusion of ferulic acid with α -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *J Pharm Biomed Anal* 2008;46:645–52.
41. Ma S-X, Chen W, Yang X-D, Zhang N, Wang S-J, Liu L, et al. Alpinetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host–guest system: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. *J Pharm Biomed Anal* 2012;67–68:193–200.
42. Swaminathan S, Pastero L, Serpe L, Trotta F, Vavia P, Aquilano D, et al. Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;74:193–201.
43. Wang D, Li H, Gu J, Guo T, Yang S, Guo Z, et al. Ternary system of dihydroartemisinin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and lecithin: Simultaneous enhancement of drug solubility and stability in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal* 2013;83:141–8.
44. Gupta P, Bansal AK. Ternary amorphous composites of celecoxib, poly(vinyl pyrrolidone) and meglumine with enhanced solubility. *Pharmazie* 2005;60:830–6.
45. Frézard F, Martins PS, Bahia APCO, Le Moyec L, de Melo AL, Pimenta AMC, et al. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ β -cyclodextrin nanoassemblies. *Int J Pharm* 2008;347:102–8.
46. Gupta P, Bansal AK. Modeling of drug release from celecoxib-PVP-meglumine amorphous system. *PDA J Pharm Sci Technol* 2005;59:346–54.
47. Gupta P, Bansal A. Molecular interactions in celecoxib-PVP- meglumine amorphous system. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:303–10.
48. Fanun M. Mmicroemulsions: properties and applications. Taylor& Francis; 2010.

49. Zhang G, Liang F, Song X, Liu D, Li M, Wu Q. New amphiphilic biodegradable β -cyclodextrin/poly(L-leucine) copolymers: Synthesis, characterization, and micellization. *Carbohydr Polym* 2010;80:885–90.
50. Fang JY, Sung KC, Lin HH, Fang CL. Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Pharm* 1999;178:83–92.
51. Mukherjee P, Sahu S, Padhan SK, Dash S, Patel S, Mohapatra PK, et al. Temperature induced emulsification and demulsification of pseudoternary mixtures of Tween80-butanol-kerosene-water system. *J Ind EngChem* 2011;50:11889–96.
52. Eugene W. Rice, Rodger B. Baird, Andrew D. Eaton LSC. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Am Water Work Assoc Public Work Assoc Environ Fed 2012;:1469.
53. Horiba. Why is particle size important? A Guidebook for particle size analysis [Internet]. [Last access: 2014 Jun 15]; Available from: http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/PSA_Guidebook.pdf
54. Dai J, Kim SM, Shin I-S, Kim JD, Lee HY, Shin WC, et al. Preparation and stability of fucoxanthin-loaded microemulsions. *J Ind Eng Chem* 2014;20:2103–10.
55. Nazir H, Lv P, Wang L, Lian G, Zhu S, Ma G. Uniform-sized silicone oil microemulsions: Preparation, investigation of stability and deposition on hair surface. *J Colloid Interface Sci* 2011;364:56–64.
56. Shi S, Chen H, Cui Y, Tang X. Formulation, stability and degradation kinetics of intravenous cinnarizine lipid emulsion. *Int J Pharm* 2009;373:147–55.
57. El Maghraby GM. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. *Int J Pharm* 2008;355:285–92.
58. Peltola S, Saarinen-Savolainen P, Kiesvaara J, Suhonen TM, Urtti A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. *Int J Pharm* 2003;254:99–107.
59. Kawakami K, Yoshikawa T, Hayashi T, Nishihara Y, Masuda K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs: II. *In vivo* study. *J Control Release* 2002;81:75–82.
60. MacLachlan I. Liposomal formulations for nucleic acid delivery. *Antisense drug Technol Princ Strateg Appl* 2007;:237.
61. Lieckfeldt R, Villalaín J, Gómez-Fernández J-C, Lee G. Apparent pKa of the Fatty Acids Within Ordered Mixtures of Model Human Stratum Corneum Lipids. *Pharm Res* 1995;12:1614–7.
62. Fábía C, Luciana B, Aline R, Carollo H, Thomazini JA, Cláudio A, et al. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve *in vitro* and *in vivo* skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J Control Release* 2011;155:400–8.

CAPÍTULO IV:

LIPOSOMAS

4.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo fue estudiar y desarrollar liposomas utilizando componentes biodegradables para la vehiculización de fármacos de escasa solubilidad acuosa. La caracterización de los sistemas se llevó a cabo mediante determinaciones del tamaño de partículas y potencial zeta, y el modo de interacción de los fármacos con los componentes de los liposomas se realizó mediante RMN-¹H. Se realizaron estudios de integridad de los liposomas para evaluar su estabilidad. Además, se pretendió evaluar el efecto de la encapsulación sobre las propiedades desfavorables de los fármacos, como la solubilidad o permeabilidad, que podrían afectar su biodisponibilidad.

4.1.1. SISTEMAS DE VEHICULIZACIÓN DE FÁRMACOS NANOESTRUCTURADOS

El objetivo de este trabajo fue estudiar y desarrollar liposomas utilizando componentes biodegradables para la vehiculización de fármacos de escasa solubilidad acuosa. La caracterización de los sistemas se llevó a cabo mediante determinaciones del tamaño de partículas y potencial zeta, y el modo de interacción de los fármacos con los componentes de los liposomas se realizó mediante RMN-¹H. Se realizaron estudios de integridad de los liposomas para evaluar su estabilidad. Además, se pretendió evaluar el efecto de la encapsulación sobre las propiedades desfavorables de los fármacos, como la solubilidad o permeabilidad, que podrían afectar su biodisponibilidad.

4.1.2. LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas coloidales cuyos tamaños se encuentran en el rango de unos pocos nanómetros a varios micrómetros de diámetro, con una o varias bicapas lipídicas rodeando compartimentos acuosos (Figura 4.1).²

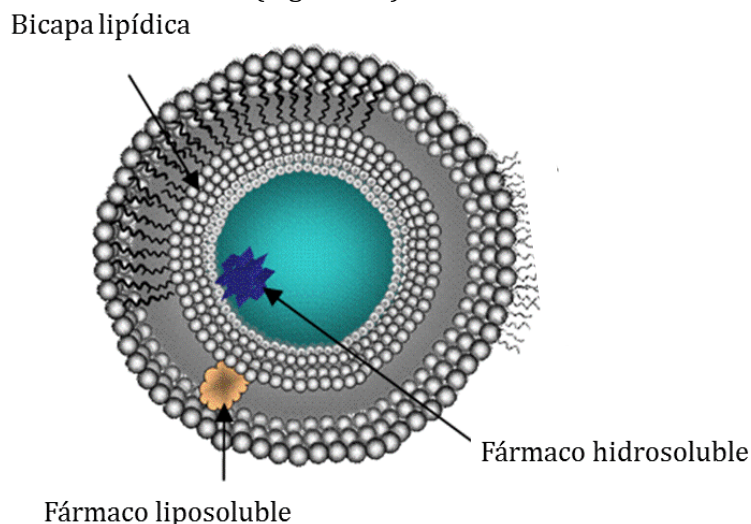


Figura 4.1. Estructura de un liposoma

Los liposomas han recibido atención por su utilidad como sistemas de membranas modelo y como sistemas de vehiculización de fármacos ya que en ellos pueden ser incorporados fármacos hidrofílicos dentro de la fase acuosa interna, mientras que los fármacos hidrofóbicos pueden insertarse dentro de la bicapa lipídica hidrofóbica (Figura 4.1).

Si bien los liposomas cargados con fármacos han sido principalmente utilizados como sistemas para la administración parenteral, su potencial aplicación como sistemas para la administración oral de fármacos también ha sido estudiada.³⁻⁵ La similitud entre las bicapas lipídicas de liposomas y las biomembranas, así como el tamaño pequeño de los mismos, es de suma importancia debido a que facilitan la absorción oral.⁵ Por ejemplo, la administración oral de proteínas o péptidos contenidos en liposomas ha demostrado incrementos en la absorción de estas biomoléculas activas.^{67,89} La incorporación en liposomas de moléculas pequeñas de fármacos de escasa permeabilidad ha incrementado su absorción oral.^{6,9-14} En particular, se han observado incrementos sustanciales en la biodisponibilidad o en la eficacia *in vivo* de fármacos escasamente solubles en agua tras su encapsulación en liposomas ya que pueden proveer incrementos en la solubilidad,^{5,15} protección del ambiente hostil del tracto gastrointestinal ^{6,16} y permiten modular la liberación de los fármacos vehiculizados.¹⁷⁻²¹ También, estos sistemas ofrecen la ventaja de reducir la toxicidad ^{20,22-24} y otros efectos adversos que pueden observarse a concentraciones similares o menores a la concentración máxima requerida para alcanzar la actividad terapéutica.^{16,24,25} Además, pueden mejorar la biodistribución^{23,26,27} y producir liberación sitio específica.^{25,26,28}

4.1.3. ESTRUCTURA, TAMAÑO Y CARGA DE LIPOSOMAS.

Los liposomas pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura y tamaño. Las **vesículas grandes multilamelares** (multilamellar large vesicles, **MLV**) son formadas por la hidratación acuosa de películas secas de lípidos. Normalmente son grandes, midiendo cientos de nanómetros de diámetro, presentan estructura compleja conteniendo una serie de bicapas concéntricas separadas mediante compartimentos acuosos angostos (Figura 4.2 a). Las **vesículas grandes unilamelares** (large unilamellar vesicles, **LUV**) presentan una única bicapa lipídica con un diámetro entre 50 y 500 nm (Figura 4.2 b). Mientras que las **vesículas pequeñas unilamelares** (small unilamellar vesicles, **SUV**) presentan una única bicapa lipídica con un diámetro menos a 50 nm (Figura 4.2 c). También, existe otra denominación de vesículas obtenidas por el método de deshidratación-rehidratación desarrollado por Kirby y Gregoriadis en 1984, conocidas como **vesículas secas reconstituídas** (Dried Reconstituted Vesicles, **DRV**).²⁹ La metodología para la obtención de las mismas se encuentra descripta en la Sección 4.1.5.2.

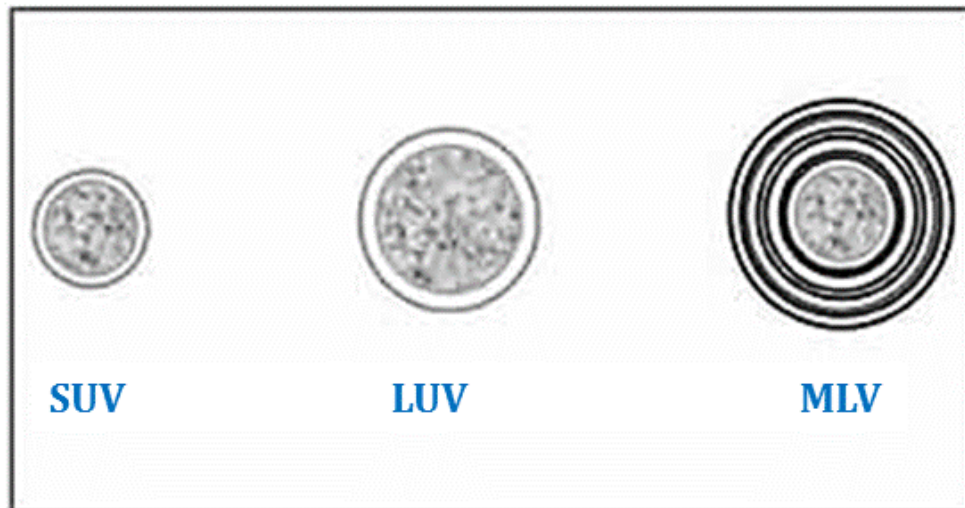


Figura 4.2. Vesículas pequeñas unilamelares (SUV), Vesículas grandes unilamelares (LUV) y Vesículas grandes multilamelares (MLV)

Los liposomas compuestos por lípidos catiónicos en general poseen carga positiva, posibilitando la interacción entre la bicapa lipídica y fármacos cargados negativamente, permitiendo una mayor capacidad de carga de la que podría alcanzarse con liposomas neutros. Las moléculas aniónicas de las superficies celulares interactúan con ellos y son responsables de la captación celular de los liposomas catiónicos. Sin embargo, las partículas neutras presentan buenos perfiles de distribución, pero son escasamente internalizados por las células. Los lípidos ionizables son componentes que permiten el ajuste de la carga del sistema mediante la simple modificación del pH luego de la encapsulación y los liposomas que los contienen se encontrarán más cercanos a la neutralidad a valores de pH cercanos al pKa de los lípidos catiónicos, como lo es el pH fisiológico, permitiéndoles evitar la opsonización por los componentes sanguíneos.³⁰ La fosfatidilcolina (FC) (Figura 4.3 a) es un surfactante de origen natural ampliamente utilizado, ya que es un componente integral de las membranas celulares por lo tanto es ampliamente biocompatible y seguro para ser administrado por vía endovenosa y por la vía oral.^{31,32} Por otro lado, para poder alcanzar los objetivos terapéuticos, los fármacos vehiculizados deben permanecer encapsulados en el liposoma.³³ Las vesículas compuestas por lípidos saturados combinados con colesterol (COL) (Figura 4.3 b) presentan mayor biocompatibilidad, por ser este un componente importante de las membranas celulares. Además, la presencia de COL puede conferir mayor rigidez a la bicapa, dependiendo de su concentración, otorgándole mayor estabilidad a los liposomas.²⁶

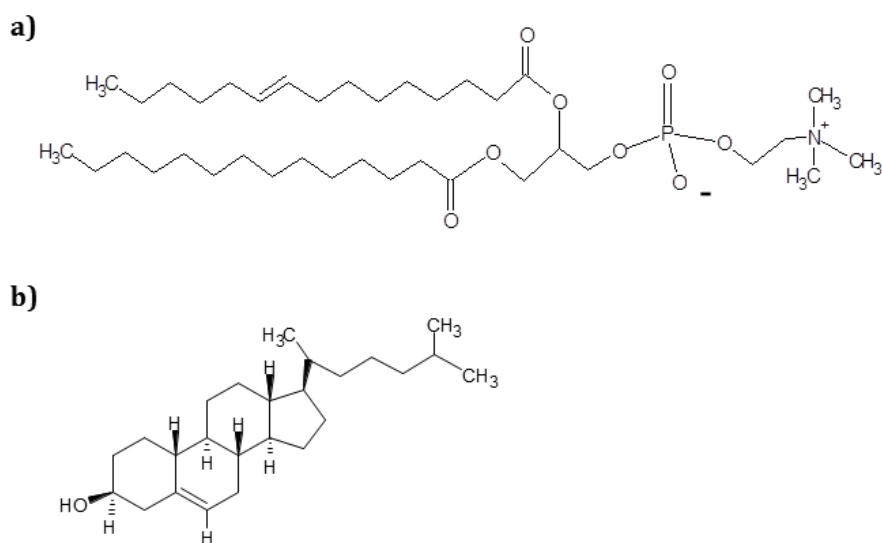


Figura 4.3. Estructuras químicas de: a) fosfatidilcolina (FC) y b) colesterol (COL).

4.1.4. FÁRMACO-EN-CICLODEXTRINAS-EN-LIPOSOMAS (FCL)

La encapsulación de cantidades suficientes de agentes terapéuticos es una de las propiedades más deseadas al utilizar sistemas de vehiculización. Existen varios factores que afectan la capacidad de encapsulación de fármacos en liposomas que involucran a las propiedades de ambos, siendo muy importantes las propiedades hidrofílicas o lipofílicas de los fármacos.³⁴ Sin embargo, la introducción de un compuesto lipofílico dentro de la fase lipídica puede ser problemático, ya que algunos fármacos pueden interferir con la formación y estabilidad de la bicapa, limitando el rango de concentración del fármaco que puede ser asociada a liposomas. Como fue mencionado en el Capítulo II, las ciclodextrinas han recibido considerable atención en el campo farmacéutico debido a su capacidad de acomodar fármacos escasamente solubles en agua dentro de su cavidad hidrofóbica, mejorando la solubilidad acuosa,³⁵⁻³⁸ la estabilidad química³⁹⁻⁴¹ y con ello mejorar la biodisponibilidad de los fármacos mediante la formación de complejos de inclusión. En base a ello, el uso de liposomas y complejos de fármacos lipofílicos con ciclodextrinas mediante la formación de fármaco-en-ciclodextrinas-en-liposomas (FCL) (Figura 4.5.) ha sido propuesto con el fin de evitar tales dificultades.^{19,42} Esta estrategia permite alojar fármacos escasamente solubles en agua dentro de la fase acuosa de las vesículas mediante su complejación con ciclodextrinas, pudiendo incrementar la proporción de masas fármaco-lípido a niveles superiores de los alcanzados mediante la incorporación convencional de fármacos dentro de la fase lipídica.¹⁵

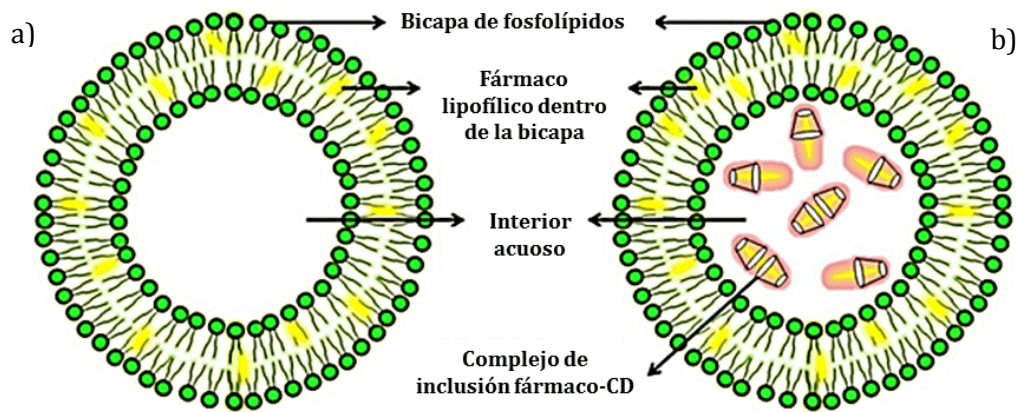


Figura 4.5. Incorporación de fármaco lipofílico en: a) liposomas en ausencia de ciclodextrinas; b) Sistemas de fármacos-en-ciclodextrinas-en-liposomas (FLC).

4.1.5. METODOLOGÍAS DE OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS.

El método de elección depende, en cada caso, del tipo de liposoma que se desea obtener y su tamaño. Influye también el tipo de fosfolípidos que se utilice y la aplicación que se pretende.⁴³

4.1.5.1. METODOLOGÍA DE HIDRATACIÓN DE CAPA DELGADA (HCD)

La obtención de liposomas del tipo MLV puede ser llevada a cabo mediante el proceso de hidratación de capa delgada (HCD) y consta de las siguientes etapas: disolución del lípido en un disolvente orgánico, evaporación a presión reducida del solvente con movimiento rotatorio simultáneo, hasta obtener una película delgada y perfectamente seca en las paredes del balón, adición de la fase acuosa y formación del MLV mediante agitación (Figura 4.4).^{43,44} Este procedimiento se debe realizar por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos.⁴⁴ Para la obtención de liposomas unilamelares a partir de MLV se pueden emplear los procedimientos de sonicación, de la prensa de French y de la extrusión secuencial. El método de sonicación puede realizarse con sondas o baños ultrasónicos. Este método aporta altos niveles de energía a la suspensión de lípidos, y es necesario lograr la exposición de MLV a la irradiación ultrasónica, siendo el método más frecuentemente usado para obtener pequeñas vesículas. La extrusión de membranas liposomales, permite reducir el tamaño de los liposomas, pasando éstos a través de un filtro de membrana de poros de tamaño definido.⁴³ Finalmente, se requiere la purificación de las SUV, ya que luego de la reducción del tamaño de las vesículas pueden quedar LUV, agregados o fármaco no encapsulado remanente, para lo cual suelen procesarse mediante centrifugación, diálisis, ultrafiltración o mediante la utilización de una columna de exclusión molecular.^{10,19,24,27,28,30,45}

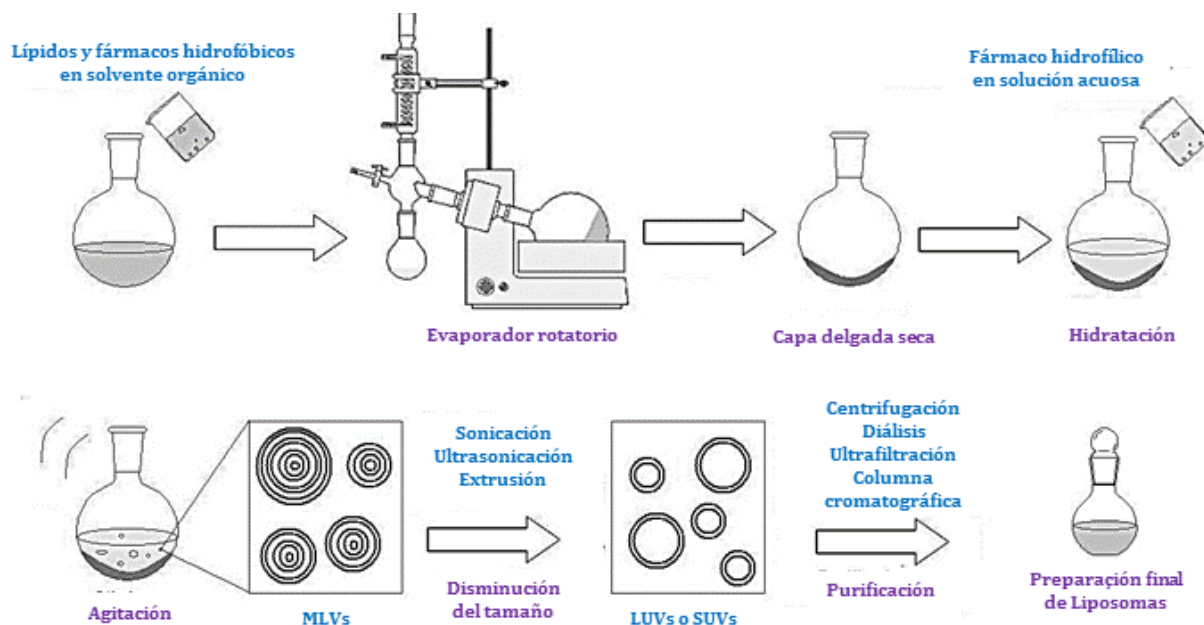


Figura 4.4. Método de Hidratación en capa delgada (HCD) para la obtención de liposomas.

4.1.5.2. METODOLOGÍA DE OBTENICÓN DE VESÍCULAS SECAS RECONSTITUÍDAS (DRV)

Las metodología de obtención de vesículas secas reconstituídas (Dried Reconstituted Vesicles, DRV) fue desarrolladas en 1984 por Kirby y Gregoriadis.⁴⁶ Las mismas son liposomas oligo- o multilamelares cuya principal ventaja es su alta capacidad de encapsulación, resultando apropiado no sólo desde el punto de vista económico, sino que también minimiza la cantidad de lípido requerida para vehiculizar una mayor cantidad de fármaco, reduciendo la posibilidad de saturación de las células y la toxicidad asociada a los lípidos. El hecho de que la técnica de obtención se lleve a cabo bajo condiciones suaves, la convierten en el método de elección para la preparación de formulaciones liposomales conteniendo sustancias activas sensibles como péptidos, proteínas o enzimas.²⁹ Sin embargo, el principal dilema del proceso de secado de liposomas es la estabilidad de la membrana de los mismos, debido por ejemplo a los cristales de hielo o a las transiciones de fase de las membranas bajo la influencia de la temperatura, o debido a la sublimación del agua de la superficie del liposoma. Por este motivo, la membrana liposomal precisa ser protegida durante el proceso de secado. Los crioprotectores son frecuentemente utilizados para proteger estructuras como proteínas, DNA y liposomas. Los mismos son capaces de formar puentes hidrógenos, estabilizando de esta manera las estructuras delicadas mediante la remoción de las moléculas de agua. Las ciclodextrinas son moléculas que presentan un alto número de grupos donores y aceptores de hidrógenos por lo que resultan de utilidad para tal fin.⁴⁷⁻⁴⁹ El método de obtención de DRV ha sido utilizado para la producción de formulaciones liposomales estables de fármacos anfifílicos, lipofílicos o de alta permeabilidad, luego de la formación de los apropiados complejos solubles fármaco-CD, los cuales son finalmente encapsulados en la región acuosa de las vesículas DRV.^{18,21,42,50} Para su obtención se debe añadir los liposomas SUV vacío hidratados con SRF (obtenidos mediante la

técnica de HCD, descrita en la Sección 4.1.5.1) con el complejo fármaco-CD pre-formado (durante 3 días, a 25 °C), diluir la mezcla mediante la adición de cantidades apropiadas de SRF (el adecuado para mantener la osmolaridad de los sistemas), liofilizar las dispersiones durante 48 h y posteriormente rehidratarlas con cantidades apropiadas de agua a una temperatura superior a la temperatura de transición de los lípidos mediante agitación vigorosa con vortex.²⁹

4.1.6. METODOLOGÍAS DE CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS.

4.1.6.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS

Existen dos métodos comúnmente utilizados para la determinación del tamaño de liposomas. El primero consiste en la visualización directa utilizando microscopía electrónica de transmisión o de barrido. Si bien la microscopía electrónica permite la examinación directa de liposomas, esta metodología no es adecuada como una técnica de control de calidad de procesos ya que la preparación de la muestra es laboriosa y lenta, y un número limitado de partículas puede ser examinado, aumentando el riesgo de que la muestra de partículas no sea representativa y ocurra un error de magnificación.

El segundo es un método indirecto, dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS), el cuál sirve para determinar el tamaño de liposomas suspendidos en un líquido, conocido como diámetro hidrodinámico. Una preparación coloidal de liposomas se encuentra en estado de movimiento aleatorio debido al movimiento Browniano. La velocidad de una dada partícula es inversamente proporcional a su tamaño, por lo cual liposomas menores se moverán más rápido que los de mayor tamaño. Cuando una suspensión de liposomas es iluminada por un láser, el movimiento, y por ende el tamaño de los liposomas, puede ser medido mediante el análisis de la tasa a la cual la intensidad de la luz fluctúa como resultado de la dispersión de luz.³⁰ La velocidad del movimiento Browniano se encuentra definido por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión translacional (D) a partir del cual puede calcularse el tamaño de una partícula mediante la utilización de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

donde d(H) es el diámetro hidrodinámico; D es el coeficiente de difusión translacional; k es la constante del Boltzmann; T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad.⁵¹

4.1.6.2. POTENCIAL ZETA

El potencial zeta es la determinación de la carga eléctrica adquirida por un liposoma. Resulta de interés por dos motivos: en primer lugar, la carga afecta la estabilidad de la partícula; en segundo lugar, la carga afecta la farmacología del liposoma. Los liposomas son partículas coloidales sujetas a la teoría de DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek)⁵² la cual sugiere que la estabilidad de un sistema coloidal se encuentra gobernada tanto por las fuerzas repulsivas de la bicapa como por las fuerzas de atracción de Van der Waals que experimentan

las partículas unas con unas. La barrera energética presentada por las fuerzas repulsivas debe ser suficientemente grande para prevenir que las partículas entren en contacto, adhiriéndose y formando agregados. Si esta barrera energética es superada, las fuerzas de Van del Waals harán que las partículas entren en contacto y las mantendrá unidas, resultando una situación insatisfactoria para una preparación liposomal para vehiculización de fármacos. El objetivo de una formulación liposomal es la preparación de partículas estables y monodispersas que mantenga tanto la monodispersidad como el tamaño de partículas para obtener un desempeño consistente. Debido a que la carga es una medida adecuada de la magnitud de la interacción entre partículas, el potencial zeta es un indicador de la estabilidad potencial de un sistema liposomal. Los liposomas con un potencial zeta grande con carga negativa o positiva se repelerán unos a otros y permanecerán monodispersos y estables. Si los liposomas presentan valores bajos de potencial zeta las fuerzas de atracción de Van der Waals son capaces de superar las fuerzas eléctricas repulsivas de las bicapas y las partículas se unirán formando agregados, y la formulación tiende a desestabilizarse. Como regla, los liposomas con potenciales zeta mayores a +30 mV o menores a -30 mV son considerados estables. Esto sugiere que los liposomas deben ser preparados de tal forma que presenten suficiente carga para aumentar la estabilidad de la preparación de partículas monodispersas. Por otro lado, una vez que los liposomas entran en la circulación sistémica pueden interaccionar con los componentes de la sangre tal como proteínas, lipoproteínas y membranas celulares. Muchas de estas entidades presentan carga ejerciendo fuerzas atractivas o repulsivas sobre los liposomas dependiendo la carga diferencial. Por este motivo, los liposomas con sustancial carga positiva o negativa (potencial zeta) si bien serán estables en su formulación, son rápidamente eliminados tras la administración sistémica, por lo que el valor absoluto del potencial zeta no debe ser muy alto.³⁰

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. MATERIALES

Fosfatidilcolina de huevo (FC), colesterol (COL) y Meglumina fueron proporcionados por Sigma Aldrich®, USA. Sulfamerazina (SMR) e Indometacina (INM) fueron adquiridos de Parafarm®, Argentina. β -CD (PM = 1135), M- β -CD (PM = 1190) e HP- β -CD (PM = 1325) fueron cordialmente donados por Ferromet® (agente en Argentina de Roquette®). Todos los materiales y solventes utilizados fueron de grado analítico. El agua purificada fue obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Milli-Q.

4.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.2.2.1. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

4.2.2.1.1. MÉTODO DE HIDRATACIÓN DE CAPA DELGADA (HCD)

Vesículas multilamelares (VML) fueron preparadas mediante la metodología de hidratación de capa delgada. Para ello, Fosfatidilcolina (FC) ((20 mg/mL) y colesterol (COL) (10 mg/mL) fueron suspendidos en una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) y combinados en diferentes relaciones FC:COL (1:1; 2:1; 3:1; 4:0) que fueron subsecuentemente sometidas a evaporación por vacío (en un balón conectado a un evaporador rotatorio) hasta la formación de una capa delgada de lípidos, la cual fue expuesta a una corriente de nitrógeno para remoción total de trazas de solvente. Para la preparación de liposomas cargados con fármaco, fue aplicado el mismo procedimiento anteriormente mencionado y SMR e INM fueron incorporadas en la fase de cloroformo/metanol (2:1 v/v) en una concentración de 1 mg/mL. La capa lipídica fue posteriormente hidratada con volúmenes apropiados de solución reguladora de pH de fosfatos (SRF) de pH 7,4. Para la obtención de vesículas pequeñas unilamelares (SUV) las dispersiones conteniendo MLV fueron sometidas a ultrasonificación utilizando un equipo Sonics and Materials, UK provisto de un microtip, por 15 min. En todos los casos la suspensión turbia inicial de liposomas fue clarificada luego de este procedimiento. Posteriormente, los liposomas fueron centrifugados por 15 min a 10.000 rpm con la finalidad de remover piezas de titanio o agregados de liposomas que podrían estar presentes en las muestras. Para la determinación de la encapsulación de los fármacos en los liposomas, las muestras fueron previamente filtradas a través de membrana con tamaño de poro de 1 μ m para remover el fármaco no incorporado de la dispersión.

4.2.2.1.2. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE VESÍCULAS DESHIDRATADAS RECONSTITUÍDAS (DRV)

El método de obtención de vesículas deshidratadas reconstituídas (DRV)⁴⁶ fue también llevado a cabo debido a su demostrada eficacia para el aumento en la encapsulación de fármacos en liposomas. Se seleccionó una relación FC:COL de 3:1 debido a que demostró una alta encapsulación de los fármacos al aplicar el método de hidratación de capa delgada.

Inicialmente, liposomas SUV fueron preparados del mismo modo que fue descrito en la Sección 4.2.2.1.1. Posteriormente, 1 mL de la dispersión conteniendo liposomas SUV fueron adicionados a 1 mL de cada complejo preparado en agua (SMR o INM con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD o de SMR con MEG en una relación estequiométrica 1:1, seleccionada a partir de los estudios expuestos en el Capítulo II). Los sistemas SUV-complejos fueron diluidos con agua milliQ para alcanzar un volumen de 10 mL. Las mezclas resultantes fueron sometidas a congelamiento (-20 °C) y luego liofilizadas (Labconco® Freeze Dry 4.5) por 48 h. Los sistemas liofilizados fueron rehidratados de forma controlada a 40 °C durante 2 h para generar DRV multilamelares.

4.2.2.2. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD Y POTENCIAL ZETA

El tamaño de partículas, el índice de polidispersidad y el potencial zeta de los liposomas estudiados fueron determinados a 25 °C utilizando un equipo Beckman Coulter® Delsa™ Nano C Particle Analyser. La función de autocorrelación de la intensidad fue medida a un ángulo de 165° asumiendo un valor de viscosidad de 0,8878 Pa y un índice de refracción de 1,3328. Las muestras fueron apropiadamente diluidas con agua Milli Q previo a su análisis. Se evaluó el efecto de las diferentes relaciones FC:COL y la influencia de la incorporación de los ligandos en los sistemas el aumento de la relación O/S en ausencia y en presencia de los fármacos.

4.2.2.3. DETERMINACIÓN DEL MODO DE INTERACCIÓN FÁRMACO-COMPONENTES.

Las señales de los espectros de RMN-¹H de las vesículas fueron asignadas en base a los espectros de los componentes puros. A partir de las diferencias en los corrimientos químicos de las señales de los liposomas, en presencia o en ausencia de fármacos, se evaluó el modo de interacción entre ellos. Los estudios de RMN-¹H fueron realizados a 298 K en un Espectrómetro Bruker® Advance II de Alta resolución utilizando tubos de 5 mm de diámetro. Los espectros de los liposomas en presencia y en ausencia de fármacos fueron obtenidos tras la incorporación de 0,1 mL de la muestra de liposomas a 0,9 mL de D₂O en presencia y en ausencia de los fármacos. Los espectros de los componentes puros fueron obtenidos mediante la dilución de cantidades apropiadas en D₂O para los fármacos, ligandos y lípidos. Todos los estudios fueron realizados a 400,16 MHz y los datos fueron procesados utilizando el software Bruker® TOPSPIN 2.0. La señal residual de solvente (4,80 ppm) fue utilizada como referencia interna. Los cambios inducidos en los corrimientos químicos ($\Delta\delta$) para los fármacos y los componentes originados debido a la interacción fueron calculadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\Delta\delta = \delta_{\text{Liposoma con Fármaco}} - \delta_{\text{Liposoma vacío}}$$
$$\Delta\delta = \delta_{\text{fármaco en liposoma}} - \delta_{\text{fármaco}}$$

4.2.2.4. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LIPOSOMAS

La integridad de las vesículas con diferentes relaciones FC:COL, en presencia y ausencia de los fármacos y ligandos fue evaluada mediante la determinación del porcentaje de retención de calceína en las vesículas.²¹ Para ello, la capa lipídica fue hidratada con volúmenes apropiados de una solución de calceína a 40 °C. Luego de la completa hidratación, durante la cual ocurre la formación espontánea de liposomas, los mismos fueron separados de la calceína no encapsulada mediante ultracentrifugación (5 ciclos de 30 min a 50000 rpm). Los liposomas fueron almacenados a 4 °C hasta el momento de su utilización. Las muestras fueron suspendidas en SRF y luego incubadas a 37 °C por 48 h. Posteriormente, los porcentajes de latencia y retención fueron determinados a diferentes tiempos, mediante la determinación de la intensidad fluorescente (EM 470 nm, EX 520 nm), antes y después del agregado de Triton X-100 en una concentración final de 1% (v/v) (para la desintegración de la membrana de los liposomas), utilizando un espectrofluorómetro Shimatzu RF-1501.

El porcentaje de latencia de calceína (% Latencia) fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Latencia} = \frac{1,1 (F_{DT} - F_{AT})}{1,1 F_{DT}} \times 100 \quad (1)$$

donde F_{AT} y F_{DT} representan los valores de fluorescencia de calceína medidos antes y después de la adición de Triton X-100, respectivamente.

El porcentaje de retención de calceína en los liposomas (% Retención) fue calculada a partir del porcentaje de latencia a cada tiempo (Latencia $_t$) y el correspondiente porcentaje de latencia inicial (Latencia $_0$)

$$\% \text{ Retención} = \frac{\text{Latencia}_t}{\text{Latencia}_0} \times 100 \quad (2)$$

4.2.2.5. ESTUDIOS DE EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

La encapsulación de drogas en liposomas está determinada por la relación molar del fármaco sobre la concentración total de lípidos [F/L (mmol/mol)].²¹ Para establecer la capacidad de encapsulación de los liposomas estudiados, el contenido de fármaco, incorporado en cada preparación liposomal fue medido utilizando espectroscopia UV-visible (Shimatzu® UV-1205). Para la determinación de la concentración de lípidos fue aplicado un ensayo colorimétrico (Stewart, 1980). Se construyeron las curvas de calibrado apropiadas a partir de soluciones estándares de los fármacos y los lípidos.

4.2.2.5.1. ENSAYO COLORIMÉTRICO DE STEWART

La cuantificación de fosfolípido presente en las muestras de liposomas fue realizada según la metodología desarrollada por Stewart en 1980, la cual es descripta a continuación:⁵³

Se tomaron alícuotas apropiadas de las muestras de liposomas diluidas en SRF y se añadieron a 2,0 mL de cloroformo en tubos de ensayo. Se añadieron 2,0 mL de reactivo de Stewart:

Cloruro férrico hexahidratado 0,1 M
Tiocianato de amonio 0,4 M

Cada una de las muestras fue sometida a agitación en vortex durante aproximadamente 1 minuto.

Las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. La fase clorofórmica fue leída espectrofotométricamente a de 485 nm. El ensayo de cuantificación de fosfolípidos fue realizado empleando triplicados de todas las muestras.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULAS, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD Y POTENCIAL ZETA

El tamaño de partículas, índice de polidispersidad y el potencial zeta de liposomas FC:COL 1:1, 2:1, 3:1 y FC dispersos en SRF de pH 7,4 obtenidos mediante la metodología de HCD fueron determinados a 25 °C (Tabla 5.1). Los valores de tamaño de partículas obtenidos se encontraron en el rango de 31,1-115 nm tanto en ausencia como en presencia de los fármacos, lo que indica que presentan tamaño pequeño (SUV) con valores de polidispersidad alrededor de 0,2, indicando que las vesículas se encuentran monodispersas. El potencial zeta de los liposomas vacíos reveló valores negativos (-0,34 a -0,03 mV), manteniendo valores similares en presencia de SMR (-2,9 a -0,07 mV) e INM (-0,41 a -0,09 mV).

Tabla 5.1. Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z de liposomas obtenidos por HCD dispersos en SRF de pH 7,4 a 25 °C.

<i>Liposomas en ausencia de fármaco</i>					
	Tamaño (nm)			IPD	Potencial zeta (mV)
FC	52	±	1	0,250	-0,03
FC:COL 3:1	79,0	±	0,8	0,220	-0,04
FC:COL 2:1	71	±	1	0,184	-0,34
FC:COL 1:1	54,2	±	0,5	0,220	0,38
<i>Liposomas con SMR</i>					
	Tamaño (nm)			IPD	Potencial zeta (mV)
FC	59,8	±	0,3	0,300	-2,0
FC:COL 3:1	115	±	1	0,156	-0,07
FC:COL 2:1	61	±	3	0,220	-2,9
FC:COL 1:1	58,9	±	0,2	0,223	-0,60
<i>Liposomas con INM</i>					
	Tamaño (nm)			IPD	Potencial zeta (mV)
FC	31,1	±	0,6	0,193	-0,15
FC:COL 3:1	68,7	±	0,6	0,198	-0,41
FC:COL 2:1	46,3	±	0,7	0,206	-0,16
FC:COL 1:1	36,6	±	0,1	0,227	-0,09

Además, el tamaño de partículas, el índice de polidispersidad y el potencial zeta de liposomas FC:COL 3:1 obtenidos mediante la metodología de deshidratación-rehidratación (DRV) en presencia de β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG fueron también determinados a 25 °C (Tabla 5.2). Si bien los valores de IPD fueron altos, indicando que los sistemas se encontraron polidispersos, por lo cual no es posible hacer inferencias con respecto al tamaño de los sistemas, los resultados obtenidos en relación al tamaño de las DRV, en presencia de los ligandos y tanto en presencia de SMR como en ausencia de la misma, se encontraron en el

rango de 139-218 nm. Por otro lado, las vesículas conteniendo ligandos en presencia de INM presentaron tamaños en el rango de 578,7 - 790,7 nm. El potencial zeta de los liposomas vacíos presentó principalmente valores negativos (-8,66 a -0,03 mV), con valores similares en presencia de SMR (-2 a 0,02 mV) e INM (-12,9 a -0,2 mV). Los resultados expuestos indican la obtención de liposomas DRV adecuados para la reconstitución al momento de la administración, debido a que los valores de potencial zeta e índice de polidispersidad sugieren que los sistemas podrían presentar baja estabilidad si son almacenados en forma de dispersión.

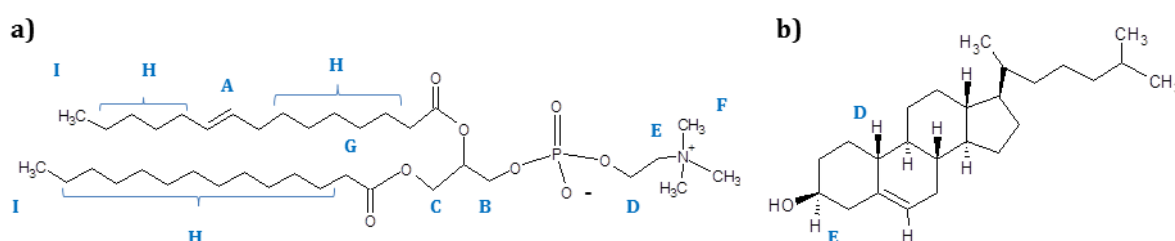
Tabla 6.1. Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z de liposomas DRV dispersos en SRF de pH 7,4 a 25 °C.

	<i>Liposomas DRV en ausencia de fármaco</i>		
	Tamaño (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
FC:COL 3:1	214 ± 19	0,194	-0,03
FC:COL 3:1 + β-CD	188 ± 32	0,400	-8,66
FC:COL 3:1 + M-β-CD	166 ± 17	0,701	-1,60
FC:COL 3:1 + HP-β-CD	139 ± 10	0,764	-3,40
FC:COL 3:1 + MEG	174 ± 36	0,973	-6,30
	<i>Liposomas DRV con SMR</i>		
	Tamaño (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
FC:COL 3:1	98 ± 30	0,156	-2,0
FC:COL 3:1 + β-CD	135 ± 44	0,502	-0,04
FC:COL 3:1 + M-β-CD	132 ± 16	0,586	0,02
FC:COL 3:1 + HP-β-CD	218 ± 69	0,999	-1,96
FC:COL 3:1 + MEG	212 ± 83	0,973	0,0008
	<i>Liposomas DRV con INM</i>		
	Tamaño (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
FC:COL 3:1	31,1 ± 0,6	0,198	-0,2
FC:COL 3:1 + β-CD	482 ± 53	0,404	-6,4
FC:COL 3:1 + M-β-CD	791 ± 101	0,979	-12,9
FC:COL 3:1 + HP-β-CD	579 ± 93	0,882	-9,9

4.3.2. DETERMINACIÓN DEL MODO DE INTERACCIÓN FÁRMACO-COMPONENTES.

Con el objetivo de determinar la posible localización de los fármacos dentro de la dispersión coloidal, los desplazamientos químicos (δ) y cambios inducidos en los corrimientos químicos ($\Delta\delta$) para los componentes de liposomas (FC y COL), de SMR e INM tras su incorporación en los liposomas fue determinados mediante RMN- ^1H y son presentados en las Tablas 4.2 y 4.3, respectivamente. Los estudios revelaron la interacción de FC y COL con los fármacos, evidenciado principalmente por corrimientos hacia campos altos de los protones correspondientes a las cadenas carbonadas de FC y en presencia de INM se observaron desplazamientos hacia campos bajos de H vecinales al grupo fosfato de FC, pudiendo deberse a la densidad de carga del carbonilo de INM que interacciona con el grupo amino de colina mediante interacciones electrostáticas (Tabla 4.2). Los protones de los fármacos presentaron todos corrimientos hacia campos altos debido a la presencia de las cadenas carbonadas hidrofóbicas de los lípidos (la señal del protón vecinal al COOH es indistinguible). Esto sugiere la localización de los fármacos en la bicapa lipídica de los mismos.

Tabla 4.2. Desplazamientos químicos (δ) y cambios inducidos en los corrimientos químicos ($\Delta\delta$) para los componentes de liposomas a) FC y b) COL tras la incorporación de SMR e INM determinados mediante ^1H .

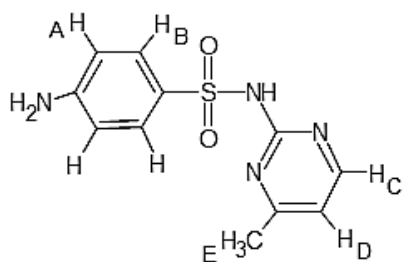


	δ (ppm)					$\Delta\delta$		
	FC	COL	FC:COL 3:1	FC:COL 3:1+SMR	FC:COL 3:1+INM	FC:COL 3:1	FC:COL 3:1+SMR	FC:COL 3:1+INM
H_A	5,2995	∅	5,3056	5,2937	5,2565	0,0061	-0,0119	-0,0491
H_B	4,2928	∅	4,285	4,2601	5,2143	-0,0078	-0,0249	0,9293
H_C	3,6854	∅	3,691	3,6747	3,8212	0,0056	-0,0163	0,1302
H_D	3,4985	3,500	3,4902	3,4761	3,515	-0,0083	-0,0141	0,0248
H_E	3,355	3,3384	3,3348	3,3155	3,3276	-0,0202	-0,0193	-0,0072
H_F	3,2473	∅	3,2506	3,2305	3,1905	0,0033	-0,0201	-0,0601
H_G	2,0384	∅	2,0462	2,0279	1,9929	0,0078	-0,0183	-0,0533
H_H	1,2616	∅	1,2886	1,2752	1,2524	0,027	-0,0134	-0,0362
H_I	0,8878	∅	0,8742	0,869	0,8593	-0,0136	-0,0052	-0,0149

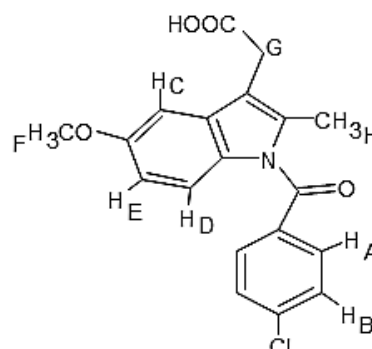
∅: señales indistinguibles; $\Delta\delta = \delta_{\text{Liposoma con Fármaco}} - \delta_{\text{Liposoma vacío}}$

Tabla 4.3. Desplazamientos químicos (δ) y cambios inducidos en los corrimientos químicos ($\Delta\delta$) para a) SMR e b) INM tras ser incorporados en los liposomas determinados mediante RMN- ^1H .

a)



b)



	$\delta(\text{ppm})$				$\Delta\delta$	
	SMR pura	INM pura	SMR en LIP FC:COL 3:1	INM en LIP FC:COL 3:1	SMR en LIP FC:COL 3:1	INM en LIP FC:COL 3:1
H_A	8,1764	7,7464	8,0113	7,6653	-0,1651	-0,0811
H_B	7,7369	7,6335	7,6256	7,5328	-0,1113	-0,1007
H_C	6,867	7,1147	6,7893	7,02545	-0,0777	-0,08925
H_D	6,8091	7,1006	6,6318	6,6643	-0,1773	-0,4363
H_E	2,3921	6,7834	2,267	5,2565	-0,1251	-1,5269
H_F	/	3,902	/	indistinguible	/	x
H_G	/	3,61	/	Indistinguible	/	x
H_H	/	2,2563	/	2,2306	/	-0,0257

$\Delta\delta = \delta_{\text{fármaco en liposoma}} - \delta_{\text{fármaco}}$; /: No corresponde asignación de señal; x: corresponde a señal indistinguible;

4.3.3. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LIPOSOMAS

La integridad de los liposomas fue evaluada mediante la determinación de la retención de calceína encapsulada en vesículas FC:COL 2:1, 3:1 o 4:0 tras la incubación en PBS a 37 °C durante 48 h. Las SUV suspendidas en PBS presentaron alta estabilidad, ya que la calceína encapsulada inicialmente permaneció dentro de las vesículas en un porcentaje superior al 80% luego de las 48 h (Figura 4.6). También, se evaluó la integridad de liposomas 3:1 conteniendo SMR e INM (Figura 4.7), en los cuáles los porcentajes de retención de calceína fueron mantenidos por encima del 80 y 95%, respectivamente indicando que las vesículas permanecieron estables en presencia de los fármacos encapsulados.

Por otro lado, se evaluó la integridad de las vesículas en presencia de ligandos (Figura 4.8), observándose que el porcentaje de retención de calceína se mantuvo por encima del 80%, con excepción de cuando fue utilizada M- β -CD, con la cuál hubo una disminución exponencial del % de retención. Existen reportes previos de que M- β -CD desestabiliza la membrana de liposomas debido a que actúa como surfactante, formando micelas con los lípidos.¹⁹ También se ha propuesto que debido a su mayor lipofilia M- β -CD atraviesa la bicapa interactuando con los lípidos del lado interno de la bicapa del liposoma.¹⁵

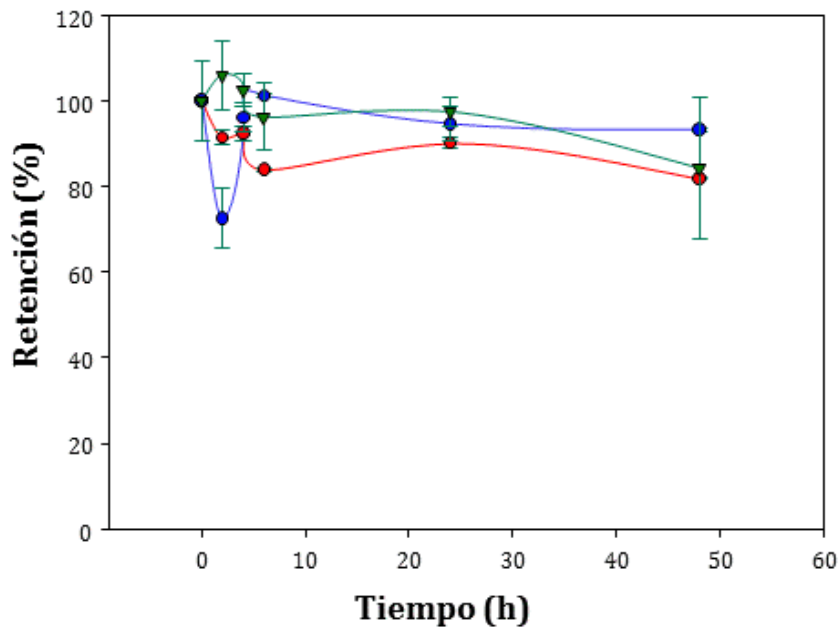


Figura 4.6. Integridad de liposomas FC:COL 2:1 (●), 3:1 (●) o FC (▼) en SRF a 37°C.

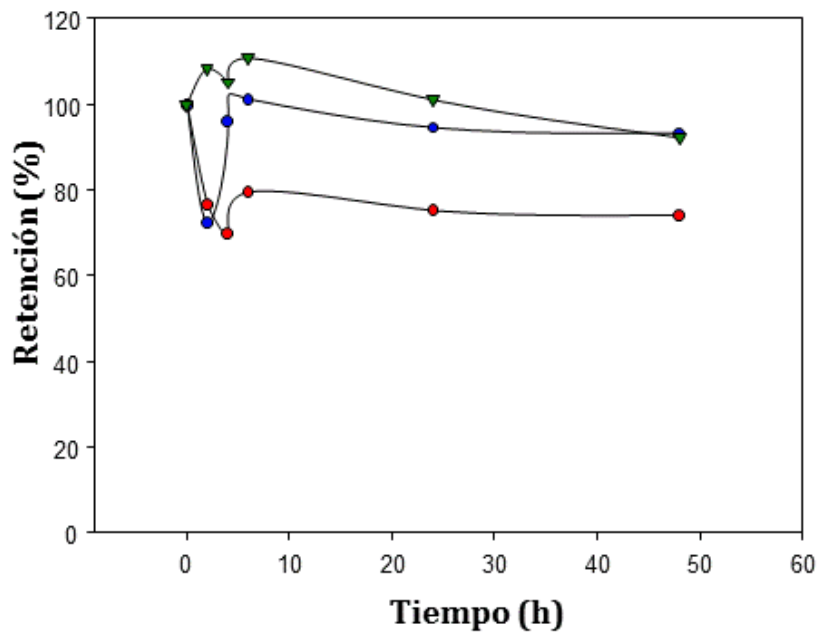


Figura 4.7. Integridad de liposomas FC:COL 3:1 vacíos (●), conteniendo SMR (●) o INM (▼) en SRF a 37°C.

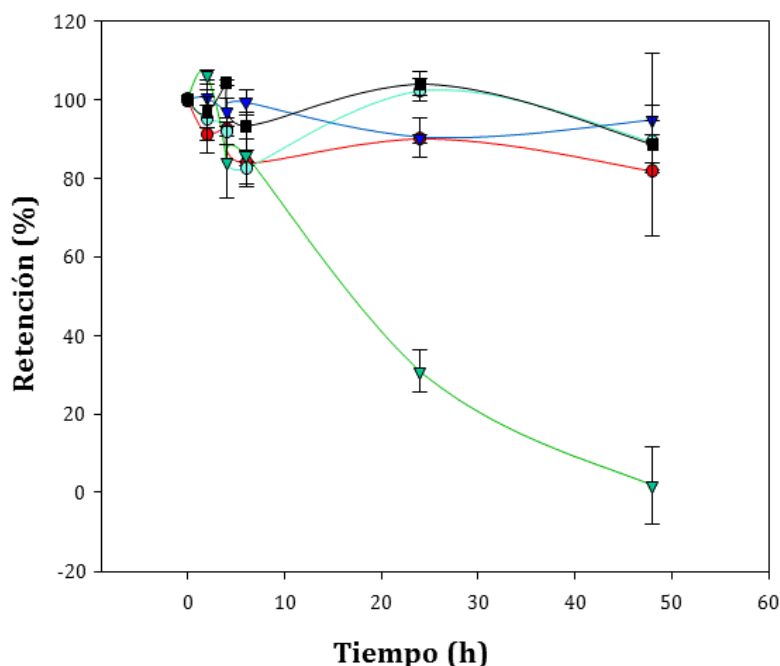


Figura 4.8. Integridad de liposomas FC:COL 3:1 en ausencia de ligandos (●) o en presencia de β -CD (▼), M- β -CD (▼), HP- β -CD (■) o MEG (●) en SRF a 37 °C.

4.3.4. ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

La encapsulación de SMR e INM en todas las formulaciones liposomales fue evaluada mediante la determinación de las relaciones molares de los fármacos sobre la concentración total de lípidos [F/L (mmol/mol)]. Los liposomas obtenidos mediante la metodología de hidratación de capa delgada (Figura 4.9) presentaron cantidades crecientes de encapsulación en relación al incremento de la cantidad de FC presente, observándose la mayor cantidad de fármacos incorporada en los liposomas formados por FC pura, obteniendo valores de F/L de 308,98 y 10,14 mmol/mol para SMR e INM, respectivamente. Esto se debe a FC posee grupos amino, que presentan carga positiva a pH 7,4, pudiendo interactuar con ambos fármacos cargados negativamente, además de presentar afinidad debido a las propiedades lipofílicas de los mismos.

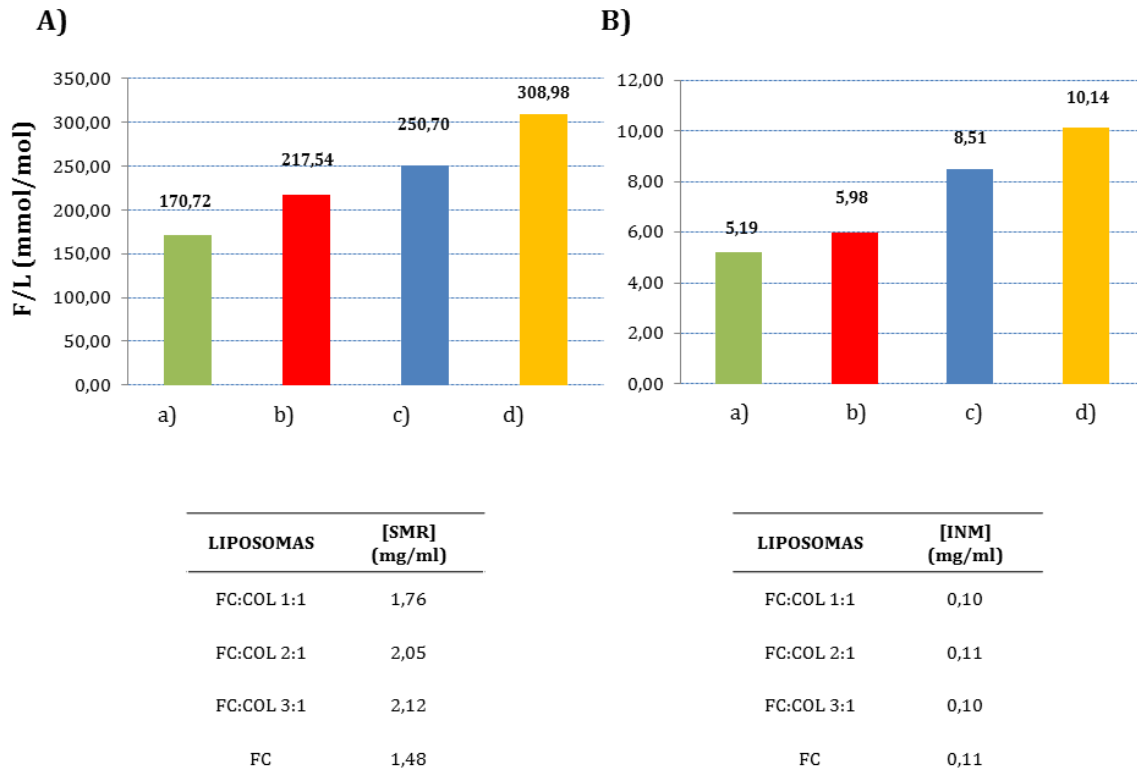


Figura 4.9. Estudios de eficiencia de encapsulación en: a) liposomas FC:COL 1:1; b) 2:1; c) 3:1; d) FC conteniendo: A) SMR e B) INM obtenidos mediante la metodología de capa delgada. F: Concentración del fármaco en mmol/mL; L: Concentración de lípidos en mol/mL [FC + COL.]

Por otro lado, las vesículas preparadas por el método de deshidratación-rehidratación (Figura 4.10) mostraron la mayor encapsulación para SMR e INM cuando se utilizaron MEG y HP-β-CD, respectivamente (5636,28 y 439,54 mmol/mol). Mediante esta metodología se logró encapsular 18 y 43 veces más que con cuando se utilizó la metodología de hidratación en capa delgada para SMR e INM, respectivamente, lo que se debe al incremento de la incorporación de los fármacos escasamente solubles en agua dentro de la fase acuosa de las vesículas mediante su complejación con las CD o MEG.

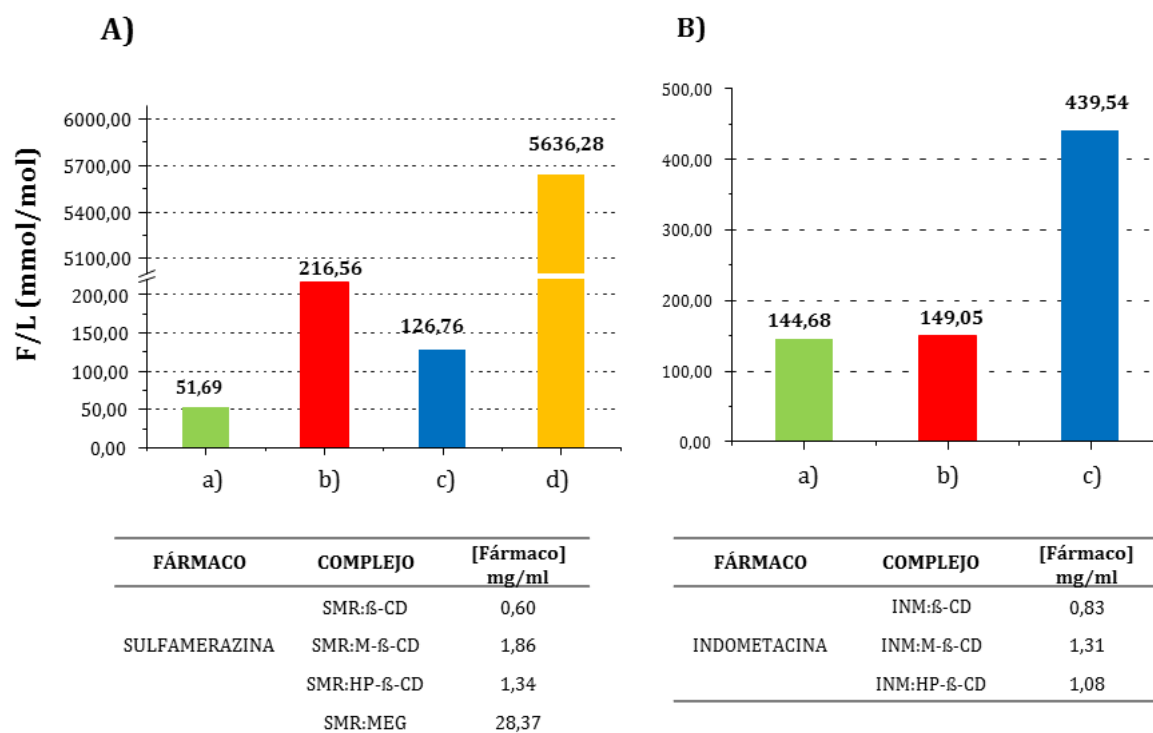


Figura 4.10. Estudios de eficiencia de encapsulación de: A) SMR e B) INM en liposomas FC:COL 3:1 conteniendo: a) β-CD; b) M-β-CD; c) HP-β-CD; d) MEG obtenidos mediante la metodología de Deshidratación-Rehidratación. **F:** Concentración del fármaco en mmol/mL; **L:** Concentración de lípidos en mol/mL [FC + COL.]

4.4. CONCLUSIONES PARCIALES

Mediante los estudios realizados fue posible desarrollar liposomas para la vehiculización de los fármacos con escasa solubilidad acuosa. Los liposomas obtenidos mediante la metodología HCD presentaron tamaño pequeño (SUV). Este parámetro se vieron poco afectados por la presencia de los fármacos. Los liposomas DRV en ausencia de fármaco y en presencia de SMR presentaron tamaño pequeño (SUV) y en presencia de INM presentaron tamaño mayor (MLV o LUV). Los sistemas se encontraron polidispersos por lo que resulta conveniente su uso para formulaciones para reconstitución. Los estudios de RMN-¹H revelaron que los fármacos presentan interacción con los lípidos de los liposomas obtenidos mediante la metodología de HCD sugiriendo su localización en la bicapa lipídica de los mismos. Las SUV suspendidas en SRF presentaron alta estabilidad PBS a 37 °C durante 48 h, y las vesículas permanecieron estables en presencia de los fármacos encapsulados y tras la incorporación de β -CD, HP- β -CD y MEG. La encapsulación de los fármacos fue alta, principalmente tras la incorporación de las CD y MEG utilizando la metodología DRV, resultando esta última prometedora para mejorar la biodisponibilidad de fármacos con escasa solubilidad acuosa.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen C-C, Tsai T-H, Huang Z-R, Fang J-Y. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and pharmacokinetics. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;74:474–82.
2. Mugabe C, Azghani AO, Omri A. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. *Int J Pharm* 2006;307:244–50.
3. Paixão P, Gouveia LF, Morais JAG. Prediction of the human oral bioavailability by using *in vitro* and *in silico* drug related parameters in a physiologically based absorption model. *Int J Pharm* 2012;429:84–98.
4. Mourão SC, Costa PI, Salgado HRN, Gremião MPD. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *Int J Pharm* 2005;295:157–62.
5. Chen Y, Lu Y, Chen J, Lai J, Sun J, Hu F, et al. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. *Int J Pharm* 2009;376:153–60.
6. Koda Y, Liang MT, Blanchfield JT, Toth I. *In vitro* stability and permeability studies of liposomal delivery systems for a novel lipophilic endomorphin 1 analogue. *Int J Pharm* 2008;356:37–43.
7. Makhlof A, Fujimoto S, Tozuka Y, Takeuchi H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of WGA-carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;77:216–24.
8. Ducat E, Deprez J, Gillet A, Noël A, Evrard B, Peulen O, et al. Nuclear delivery of a therapeutic peptide by long circulating pH-sensitive liposomes: benefits over classical vesicles. *Int J Pharm* 2011;420:319–32.
9. Kowapradit J, Apirakaramwong A, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Sajomsang W, Opanasopit P. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan coated liposomes for oral protein drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2012;47:359–66.
10. Markoutsas E, Pampalakis G, Niarakis A, Romero I a., Weksler B, Couraud PO, et al. Uptake and permeability studies of BBB-targeting immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;77:265–74.
11. Langguth P, Kubis A, Krumbiegel G, Lang W, Merkle HP, Wächter W, et al. Intestinal absorption of the quaternary trospium chloride: permeability-lowering factors and bioavailabilities for oral dosage forms. *Eur J Pharm Biopharm* 1997;43:265–72.
12. Chen D, Xia D, Li X, Zhu Q, Yu H, Zhu C, et al. Comparative study of Pluronic(®) F127-modified liposomes and chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats. *Int J Pharm* 2013;449:1–9.
13. Niu M, Tan Y, Guan P, Hovgaard L, Lu Y, Qi J, et al. Enhanced oral absorption of insulin-loaded liposomes containing bile salts: a mechanistic study. *Int J Pharm* 2014;460:119–30.
14. Hu S, Niu M, Hu F, Lu Y, Qi J, Yin Z, et al. Integrity and stability of oral liposomes containing bile salts studied in simulated and *ex vivo* gastrointestinal media. *Int J Pharm* 2013;441:693–700.

15. Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L. Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. *Int J Pharm* 2006;312:75–82.
16. Chen C, Johnston TD, Jeon H, Gedaly R, McHugh PP, Burke TG, et al. An *in vitro* study of liposomal curcumin: Stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. *Int J Pharm* 2009;366:133–9.
17. Fatouros D, Gortzi O, Klepetsanis P, Antimisiaris SG, Stuart MC a, Brisson A, et al. Preparation and properties of arsonolipid containing liposomes. *Chem Phys Lipids* 2001;109:75–89.
18. Kallinteri P, Antimisiaris SG, Karnabatidis D, Kalogeropoulou C, Tsota I, Siablis D. Dexamethasone incorporating liposomes: An *in vitro* study of their applicability as a slow releasing delivery system of dexamethasone from covered metallic stents. *Biomaterials* 2002;23:4819–26.
19. Hatzi P, Mourtas S, G. Klepetsanis P, Antimisiaris SG. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. *Int J Pharm* 2007;333:167–76.
20. Manca ML, Loy G, Zaru M, Fadda AM, Antimisiaris SG. Release of rifampicin from chitosan, PLGA and chitosan-coated PLGA microparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2008;67:166–70.
21. Fatouros DG, Hatzidimitriou K, Antimisiaris SG. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:287–96.
22. Zaru M, Manca ML, Fadda AM, Antimisiaris SG. Chitosan-coated liposomes for delivery to lungs by nebulisation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2009;71:88–95.
23. Zagana P, Haikou M, Klepetsanis P, Giannopoulou E, Ioannou P V., Antimisiaris SG. In vivo distribution of arsonoliposomes: Effect of vesicle lipid composition. *Int J Pharm* 2008;347:86–92.
24. Morand K, Bartoletti a. C, Bochot A, Barratt G, Brandely ML, Chast F. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: Physico-chemical and formulation stability. *Int J Pharm* 2007;344:150–3.
25. Stark B, Andrae F, Mosgoeller W, Edetsberger M, Gaubitzer E, Koehler G, et al. Liposomal vasoactive intestinal peptide for lung application: Protection from proteolytic degradation. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70:153–64.
26. Antimisiaris SG, Klepetsanis P, Zachariou V, Giannopoulou E, Ioannou P V. In vivo distribution of arsenic after i.p. injection of arsonoliposomes in balb-c mice. *Int J Pharm* 2005;289:151–8.
27. Zagana P, Klepetsanis P, Ioannou P V., Loiseau PM, Antimisiaris SG. Trypanocidal activity of arsonoliposomes: Effect of vesicle lipid composition. *Biomed Pharmacother* 2007;61:499–504.
28. Taylor M, Moore S, Mourtas S, Niarakis A, Re F, Zona C, et al. Effect of curcumin-associated and lipid ligand-functionalized nanoliposomes on aggregation of the Alzheimer's α -peptide. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2011;7:541–50.
29. Antimisiaris SG. Preparation of DRV Liposomes. *Methods Mol Biol* 2010;605:51–75.
30. MacLachlan I. Liposomal formulations for nucleic acid delivery. *Antisense drug Technol Princ Strateg Appl* 2007;;237.

31. Margulis-goshen K, Kesselman E, Danino D, Magdassi S. Formation of celecoxib nanoparticles from volatile microemulsions. *Int J Pharm* 2010;393:230–7.
32. Graf A, Ablinger E, Peters S, Zimmer A, Hook S, Rades T. Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants : Nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. *Int J Pharm* 2007;350:351–60.
33. Shabbits JA, Chiu GNC, Mayer LD. Development of an *in vitro* drug release assay that accurately predicts *in vivo* drug retention for liposome-based delivery systems. *J Control Release* 2002;84:161–70.
34. Nii T, Ishii F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *Int J Pharm* 2005;298:198–205.
35. Brewster ME, Vandecruys R, Peeters J, Neeskens P, Verreck G, Loftsson T. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. *Eur J Pharm Sci* 2008;34:94–103.
36. Mishur RJ, Griffin ME, Battle CH, Shan B, Jayawickramarajah J. Molecular recognition and enhancement of aqueous solubility and bioactivity of CD437 by β -cyclodextrin. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:857–60.
37. Djekic L, Primorac M, Filipic S, Agbaba D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. *Int J Pharm* 2012;433:25–33.
38. Delrivo A, Zoppi A, Longhi MR. Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state. *Carbohydr Polym* 2012;87:1980–8.
39. Anselmi C, Centini M, Maggiore M, Gaggelli N, Andreassi M, Buonocore A, et al. Non-covalent inclusion of ferulic acid with α -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *J Pharm Biomed Anal* 2008;46:645–52.
40. Swaminathan S, Pastero L, Serpe L, Trotta F, Vavia P, Aquilano D, et al. Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;74:193–201.
41. Loukas YL, Vraka V, Gregoriadis G. Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. *Int J Pharm* 1998;162:137–42.
42. McCormack B, Gregoriadis G. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs *in vivo*. *Int J Pharm* 1998;162:59–69.
43. Pérez MG. Los liposomas : usos y perspectivas. 2004;:8–33.
44. Lanio ME, Luzardo MC, Laborde R, Sánchez O, Cruz Y, Pazos F, et al. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev Cuba Física* 2009;26:23–30.
45. Watanabe M, Kawano K, Yokoyama M, Opanasopit P, Okano T, Maitani Y. Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability. *Int J Pharm* 2006;308:183–9.
46. Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration- rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* 1984;2:979–84.

47. Blanch E, Tomás C, Hernández M, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM, et al. Egg yolk and glycerol requirements for freezing boar spermatozoa treated with methyl β -cyclodextrin or cholesterol-loaded cyclodextrin. *J Reprod Dev* 2014;60:143-9.
48. Lee M-Y, Min S-G, You S-K, Choi M-J, Hong G-P, Chun J-Y. Effect of β -cyclodextrin on physical properties of nanocapsules manufactured by emulsion-diffusion method. *J Food Eng* 2013;119:588-94.
49. Awad MMM. Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity. *Small Rumin Res* 2011;100:164-8.
50. McCormack B, Gregoriadis G. Drugs-in-cyclodextrins-in liposomes: a novel concept in drug delivery. *Int J Pharm* 1994;112:249-58.
51. Malvern Instruments Ltd. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*. Worcestershire, UK:.
52. Salager J-L. *Teorías relativas a la estabilidad de coloides liofobicos (DLVO y Von Smoluchovski)*. 3rd ed. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química; 2007.
53. Stewart J. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem* 1980;104:10-4.

CAPÍTULO V:

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

5.1. INTRODUCCIÓN

La propiedad clave que se pretende para un producto farmacéutico es su eficacia terapéutica. Sin embargo, el tiempo y costo que insumen las pruebas clínicas *in vivo* las hacen inadecuadas como método de control de calidad de rutina. Por este motivo, las pruebas *in vitro* son frecuentemente utilizadas para asegurar la calidad y el desempeño de un producto farmacéutico. La evaluación de la velocidad de liberación *in vitro* de un fármaco, contenido en un sistema de vehiculización farmacéutico, puede ser relacionada con la salida del mismo de la matriz,¹ siendo esta etapa fundamental en la farmacocinética del IFA y puede reflejar el efecto de la combinación de parámetros físicos y químicos, incluyendo la solubilidad y el tamaño de partículas de la formulación.² A partir de ello, el objetivo de este capítulo comprende el estudio de la capacidad de los complejos binarios y ternarios con CD y/o MEG, microemulsiones y liposomas, en ausencia y en presencia de ligandos, para el transporte y liberación de SMR e INM mediante la determinación de la difusión a través de una membrana de acetato de celulosa.

5.1.1. SISTEMAS PORTADORES DE FÁRMACOS

Un sistema portador de fármacos de fármacos puede definirse como un dispositivo o una formulación capaz de introducir una sustancia terapéutica dentro del organismo, de modo que incremente su seguridad y eficacia. El aumento en la eficacia puede ser ocasionado por una mayor localización del IFA en el sitio de acción,³⁻⁶ por mejoras en la biodisponibilidad del fármaco ⁷⁻⁹ y duración sostenida de la acción del mismo.¹⁰⁻¹² Los sistemas de liberación sostenida han sido ampliamente estudiados por varias décadas y se han logrado importantes beneficios en el área farmacéutica.¹³⁻¹⁸ Un sistema de vehiculización que es capaz de producir un efecto terapéutico prolongado, mediante la liberación lenta de la sustancia terapéutica durante un período extendido tras la administración de una única dosis, es considerado un sistema de liberación sostenida. Los mismos presentan varias ventajas, como menor frecuencia de administración, menores efectos adversos, niveles de absorción estables de fármacos en la sangre y plasma, mejoras en el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.¹²

5.1.2. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS A PARTIR DE DISPERSIONES ACUOSAS

El dispositivo recomendado por la FDA, para la determinación de la velocidad de liberación de dispersiones acuosas, son las celdas de difusión de Franz. En general, se recomienda el uso de seis celdas, pero para algunos sistemas se menciona el uso de tres o de sólo una. La celda de difusión de Franz vertical (Figura 5.1) consiste en un compartimento donador y un compartimento receptor, separados por una membrana. El compartimento donador contiene la preparación farmacéutica y el compartimento receptor alberga al medio de recepción.

Para los ensayos de determinación de la liberación, normalmente se utilizan membranas artificiales, las cuales deben permitir la rápida difusión del ingrediente activo hacia el compartimento receptor a medida que es "liberado" de la formulación y no debe ser limitante de la velocidad de difusión. El compartimento receptor debe presentar agitación constante para asegurar la uniformidad de la difusión y la homogeneidad de la concentración del fármaco. La difusión es dependiente de la temperatura, por lo tanto el compartimento receptor debe mantenerse a temperatura constante. Al llevar a cabo el experimento, se deben extraer muestras del compartimento receptor a diferentes intervalos de tiempo.²

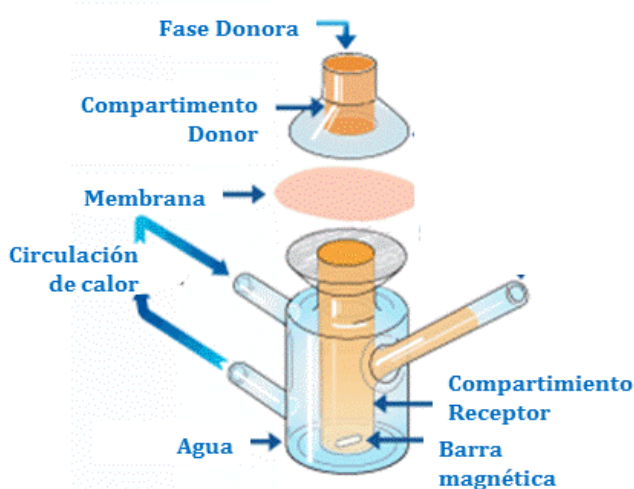


Figura 5.1. Celda de Difusión de Franz vertical utilizadas para estudios de liberación de dispersiones acuosas.

5.1.3. SISTEMAS PORTADORES DE FÁRMACOS A PARTIR DE SISTEMAS BINARIOS Y TERNARIOS

5.1.3.1. TRANSPORTE DE FÁRMACOS A PARTIR DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS

Las CD presentan características estructurales únicas. Por un lado, poseen un exterior hidrofílico que les confiere solubilidad acuosa y, por el otro, poseen una cavidad interna hidrofóbica que les provee un microambiente donde alojan moléculas completas o una parte apolar de las mismas, para formar complejos de inclusión.¹⁹ Las CD y sus derivados pueden modificar la velocidad de liberación de fármacos, a través de diferentes vías de administración, así como pueden servir como potentes vehiculizadores de IFA en formulaciones de liberación inmediata y prolongada.²⁰ Existen diferentes explicaciones para el efecto modulador en la vehiculización de fármacos, que presentan las CD, mediante la formación de complejos. Constantin et al. establecieron que compuestos que forman complejos de inclusión fuertes, muestran valores de tiempo de retención del IFA mayores, mientras que aquellos que forman complejos más débiles exhiben valores más bajos, es decir que la velocidad de liberación de un fármaco se encuentra controlada principalmente por la disociación de

la molécula huésped de la cavidad de la CD.²¹ Por su parte, Loftsson afirmó que las velocidades de formación y disociación de los complejos IFA/CD son muy cercanas a los límites del control de difusión, ya que los complejos están continuamente formándose y disociándose. Las membranas biológicas normalmente poseen un exterior hidrofílico y un interior lipofílico y, adyacente a la superficie de las mismas, existe una capa estática de agua que actúa como barrera para fármacos de difusión rápida. Existen evidencias en la literatura que CD pueden, bajo ciertas condiciones, incrementar la difusión de compuestos lipofílicos a través de esta barrera acuosa.²² Consecuentemente, la presencia de los complejos hidrosolubles, en la superficie hidratada del epitelio, con frecuencia logrará incrementar la biodisponibilidad del fármaco disuelto, especialmente si el mismo es lipofílico y de baja solubilidad acuosa.²³ Además, la lipofilidad relativa de la membrana posee baja afinidad hacia las moléculas hidrofílicas de CD, por lo que las mismas permanecerán en el exterior acuoso de la membrana, en el vehículo acuoso del sistema o en los fluidos acuosos, como la saliva o las lágrimas.¹⁹ Matsuda et al. sugieren que el efecto en el incremento de la liberación de fármacos por las CD hidrofílicas puede explicarse mediante el aumento en la actividad termodinámica de los IFA en el vehículo.⁶ Por el contrario, las CD hidrofóbicas pueden retardar la liberación de los fármacos a partir del vehículo. Como ejemplo, Umemura et al. y Tomono et al. reportaron que la velocidad de liberación de nitroglicerina fue acelerada mediante la complejación con dietil- β -ciclodextrina (hidrofílica) y retardada mediante la complejación con β -CD (hidrofóbica).^{10,24} Los resultados obtenidos por Higashi et al. indicaron que agregados supramoleculares de insulina pegilada, con α - y γ -CD, produjeron un efecto de liberación prolongada de este IFA.²⁵ Por su parte, Fernandes et al. reportaron que la liberación de nicardipina fue sustancialmente retardada mediante la complejación con triacetil- β -ciclodextrina (hidrofílica).²⁶

5.1.3.2. TRANSPORTE DE FÁRMACOS A PARTIR DE LA FORMACIÓN DE SALES

La formación de sales es una técnica bien establecida para el incremento de la velocidad de disolución y consecuentemente, de la biodisponibilidad oral de moléculas activas pequeñas, ya que al facilitar la disolución de las mismas, en el ambiente acuoso del tracto gastrointestinal, resulta un proceso favorable para compuestos que, de otra manera, sufrirían la falta de exposición a las membranas responsables de la absorción.²⁷ Si bien se espera que las sales presenten velocidades de liberación mayores que las de los fármacos ácidos o bases débiles libres, también existen situaciones en las que las sales retardan la liberación en condiciones fisiológicas.²⁸

MEG es capaz de interactuar con compuestos ácidos débiles, por lo cual se la ha utilizado para la obtención de sales de IFA poco solubles en agua, habiendo demostrado incrementar la velocidad de liberación ²⁹⁻³¹ de moléculas con propiedades ácidas débiles, como aceclofenac y diclofenac.³² Frezard et al. reportaron un efecto de liberación sostenida de antimonio mediante la vehiculización como antimoniato de MEG con β -CD.²⁹ A su vez, sistemas ternarios amorfos de celecoxib, polivinilpirrolidona y MEG presentaron una rápida disolución.³¹ Así como también, dispersiones sólidas basadas en nanoemulsiones, conteniendo MEG como alcalinizante, incrementaron la liberación inicial de aceclofenac en medio gástrico simulado.³² Sumado a lo anterior, es importante destacar que existen pocos datos en la literatura acerca del efecto

concerniente a MEG en la liberación de fármacos. Por este motivo, resulta de interés evaluar la influencia de MEG sobre el transporte y liberación de SMR.

5.1.3.3. TRANSPORTE DE FÁRMACOS A PARTIR DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS TERNARIOS CON CICLODEXTRINAS

El efecto modulador de la liberación por parte de CD, puede ser modificado mediante el uso de un componente ternario apropiado, tal como la incorporación de polímeros al medio de complejación,^{30,33} la ionización del fármaco y formación de sales,³⁴⁻³⁶ o la adición de sales orgánicas.²³ Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que complejos ternarios de HP- β -CD, trietanolaminas y acetazolamida en estado sólido presentaron incrementos en la velocidad de liberación del IFA.³⁷ Mura et al. desarrollaron complejos ternarios de HP- β -CD con aminoácidos para la liberación rápida de naproxeno a partir de formulaciones sólidas,³⁵ mientras que Sajeesh et al. desarrollaron hidrogeles con micropartículas conteniendo insulina acomplejada con M- β -CD para la vehiculización del IFA por la vía oral.³⁸ La formación de complejos ternarios de itraconazol con HP- β -CD y el polímero Soluplus®, demostraron ser formulaciones apropiadas para la liberación rápida del fármaco.⁹ Complejos ternarios de zaloplon, con hipromelosa y β -CD o M- β CD presentaron una liberación más inmediata del IFA respecto a los correspondientes complejos binarios con ambas CD.³⁹

Ante lo expuesto, resulta de interés poder evaluar la eficacia de MEG, como un componente ternario en complejos de fármacos, con carácter de ácidos débiles, con CD y su efecto sobre la liberación de los IFA.

5.1.4. TRANSPORTE DE FÁRMACOS A PARTIR DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS

Durante las recientes décadas varios sistemas coloidales han sido investigados como portadores de diferentes IFA. Una de las propiedades más importantes de un sistema portador de fármacos nanoestructurado es el perfil de liberación, el cuál describe como el IFA difunde hacia el exterior del transportador coloidal luego de la administración.⁴⁰ Varios sistemas lipídicos, tales como microemulsiones,⁴¹⁻⁴⁴ nanoemulsiones,^{16,32} y liposomas⁴⁵⁻⁴⁸ han sido recientemente aplicados para la vehiculización de fármacos por diferentes vías de administración.⁴⁹

5.1.4.1. TRANSPORTE DE FÁRMACOS A PARTIR DE MICROEMULSIONES

Recientemente, las microemulsiones han sido aplicadas para el transporte de diferentes fármacos lipofílicos.^{40,50} Las mismas proveen diferentes perfiles de liberación, dependiendo de las propiedades físico-químicas de los componentes, tales como la lipofilidad de la fase oleosa, los coeficientes de partición de los fármacos y el tipo de surfactante utilizado; de la estructura interna de la microemulsión [agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W)]; así como de las interacciones entre el IFA y el vehículo.^{51,52} Además, mediante la elección adecuada de las proporciones de la fase

oleosa y los surfactantes que la componen, las ME pueden proveer liberación controlada de fármacos.⁵² Montenegro et al. observaron que la liberación de octilmetoxicinamato, un filtro UVB ampliamente utilizado, a partir de ME, utilizando diferentes fases oleosas y emulsificantes, experimentó la influencia tanto por la lipofiliidad como de la estructura de los lípidos utilizados.⁵² Padula et al. reportaron un efecto de retención de levotiroxina de sodio tras su vehiculización en ME para la administración transdérmica.⁵³ La liberación de paclitaxel, a partir de ME compuestas por capriol 90, tween y agua fue mayor en comparación con la dispensa del fármaco en solución y a partir de suspensiones.¹⁶

5.1.4.2. TRANSPORTE DE FÁRMACOS A PARTIR DE LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas microscópicas compuestas por una o más capas lipídicas encapsulando compartimentos acuosos.⁵⁴ Recientemente, estos sistemas han sido utilizados para mejorar el efecto terapéutico de fármacos, ya que se considera que la mayoría de las formulaciones de liposomas reducen la toxicidad y que, en alguna medida, aumentan la concentración de los IFA en el sitio de acción. Las formulaciones actuales, conteniendo liposomas, inhiben la rápida eliminación biológica de las mismas a través del control de su tamaño, de su carga y de su hidratación superficial.⁵⁵ Debido a su carácter bifásico, los liposomas son capaces de actuar como transportadores, tanto de IFA hidrofílicos como lipofílicos. Los fármacos, dependiendo de sus características de solubilidad y de partición, pueden localizarse en diferentes regiones del ambiente liposomal y así, exhibir distintas propiedades de encapsulación y liberación. Los IFA altamente lipofílicos son encapsulados principalmente dentro de la bicapa de los liposomas y, al presentar baja solubilidad acuosa, la pérdida de fármaco encapsulado durante el almacenamiento es mínima. Debido a su alta biocompatibilidad, los liposomas han sido utilizados como sistemas de vehiculización de diversos IFA.⁵⁴ Tsukamoto et al. desarrollaron liposomas para la vehiculización de bromfenac en gotas oftálmicas, observando la liberación sostenida del fármaco por varias horas.⁵⁶ Crielaard et al. obtuvieron un efecto de liberación continua de colchicina, a partir liposomas PEGilados hidrolizables.⁵⁷ Por su parte, Mura et al. indicaron que a partir de formulaciones liposomales de benzocaina observaron un efecto de liberación sostenida y un efecto anestésico más intenso del IFA.⁵⁸

5.1.5. TRANSPORTE DE FÁRMACOS INCORPORADOS EN SISTEMAS BINARIOS A PARTIR DE SISTEMAS PORTADORES NANOESTRUCTURADOS

5.1.5.1. TRANSPORTE DE FÁRMACOS A PARTIR DE MICROEMULSIONES CONTENIENDO β -CD, M- β -CD, HP- β -CD Y MEG.

La interacción de fármacos con microemulsiones, en combinación con CD o MEG, puede mejorar favorablemente las propiedades indeseadas de ingredientes farmacológicamente activos, pudiendo incrementar los beneficios que presentan los sistemas por separado. Además, la adición de

ligandos, como cosurfactantes en ME, puede modificar la estabilidad y la estructura de los sistemas permitiendo reducir su dosis.⁵⁹ Sin embargo, los datos presentes en la literatura acerca del comportamiento de liberación de fármacos incorporados a este tipo de sistemas combinados, son escasos y se limitan a la incorporación de algunas CD, mientras que estudios de ME en presencia de MEG no han sido reportados aún. Entre ellos, Dalmora et al. informaron que complejos de piroxicam con β -CD incorporados a ME, compuestas por bromuro de hexadeciltrimetilamonio, isopropil miristato y solución reguladora de pH, produjeron un efecto de reservorio sobre la liberación del fármaco.⁶⁰ Richter et al. realizaron estudios de difusión, a través de una membrana de celulosa, de androstenediona contenida en ME con la adición de HP- γ -CD como co-surfactante, observando una disminución de un 20% en la difusión del IFA; mientras que a partir de la ME solamente, la difusión comenzó luego de 300 min.⁶¹ Es importante recordar que en el capítulo III fueron expuestas las ventajas de la combinación de microemulsiones con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG como estrategia para la vehiculización de SMR e INM, observándose incrementos significativos de la solubilidad acuosa de los fármacos con todas las ME, conteniendo los ligandos, principalmente al incorporar MEG al 5% agua y β -CD al 1,8% en SRF 8 para SMR (35,6 mg/mL) e INM (73,1 mg/mL), respectivamente. Además, fue posible la obtención de regiones isotrópicas mayores y los estudios de conductividad y DLS indicaron que los ligandos no modificaron la microestructura interna de las ME. En base a ello, resulta de interés examinar el efecto de estas formulaciones sobre la liberación de SMR e INM, ya que las mismas aportan importantes beneficios para la vehiculización de los fármacos.

5.1.5.2. TRANSPORTE DE FÁRMACOS A PARTIR DE LIPOSOMAS CONTENIENDO β -CD, M- β -CD, HP- β -CD Y MEG.

La estrategia de combinación de liposomas y complejos de fármacos lipofílicos con ciclodextrinas mediante la formación de fármaco-en-ciclodextrinas-en-liposomas (FCL) permite alojar fármacos escasamente solubles en agua dentro de la fase acuosa de las vesículas mediante su complejación con CD, pudiendo incrementar la proporción de masas fármaco-lípido a niveles superiores de los alcanzados mediante la incorporación convencional de fármacos dentro de la fase lipídica.^{47,62} En las últimas décadas, numerosas publicaciones, acerca de estos sistemas y su efecto sobre la liberación *in vitro* han sido expuestos en la literatura. Piel et al. reportaron que la cinética de liberación de β metasona, a partir de liposomas conteniendo HP- γ -CD, HP- β -CD y M- β -CD, de diferentes grados de metilación presentó una relación directa con la eficiencia de encapsulación, así como que HP- β -CD produjo una liberación más lenta del fármaco.⁶³ Maestrelli et al. observaron un efecto prolongado en la liberación de ketoprofeno a partir de liposomas compuestos por FC y COL conteniendo HP- β -CD.⁶⁴ Así mismo, la liberación de prednisolona, desde liposomas compuestos por FC y COL conteniendo HP- β -CD, presentó una buena retención del fármaco.⁶⁵ En el capítulo IV fueron presentados los resultados obtenidos con los sistemas FCL preparados por el método de deshidratación-rehidratación, los cuales permitieron encapsular cantidades altas de los IFA, principalmente al utilizar MEG e HP- β -CD, para SMR (5636,28 mmol/mol) e INM (439,54

mmol/mol), respectivamente. Además, las vesículas permanecieron estables en presencia de los fármacos encapsulados y tras la incorporación de β -CD, HP- β -CD y MEG. Considerando estos resultados, es importante evaluar la liberación de los IFA a partir de las formulaciones, debido a que es una propiedad del sistema fundamental para alcanzar la eficacia terapéutica.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. MATERIALES

Sulfamerazina e Indometacina fueron adquiridos de Parafarm®, Argentina. Meglumina fue proporcionado por Sigma Aldrich®, USA; β -CD (PM = 1135), M- β -CD (PM = 1190) e HP- β -CD (PM = 1325) fueron cordialmente donados por Ferromet® (agente en Argentina de Roquette®). Para la preparación de las ME se utilizaron Fosfatidilcolina de soja (FCS), (Degussa Texturants, Alemania); Polioxietilenglicerol trihidroxiestearato (PEG)-40 (Eumulgin® HRE 40) (EU) (número CAS 61788-85-0, proporcionado por Pharma Special, São Paulo, Brazil) y Oleato de Sodio (OS) como sistema de surfactantes (S). El oleato de sodio fue obtenido mediante la reacción estequiométrica de ácido oléico con NaOH 1M durante 30 min. El precipitado formado fue filtrado y lavado con 3 porciones de acetona de 100 mL cada una. La fase oleosa (O) fue constituida por Aceite de Soja (AS) (Liza®), mientras que la fase acuosa (W) fue conformada por Agua o Solución Reguladora de pH conteniendo Fosfatos (SRF). Fosfatidilcolina (FC) y colesterol (COL), para la preparación de los liposomas, fueron proporcionado por Sigma Aldrich®, USA. Todos los materiales y solventes utilizados fueron de grado analítico. El agua purificada fue obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Milli-Q.

5.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.2.2.1. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Los experimentos de liberación fueron realizados usando de celdas de difusión de Franz verticales MicroettePlus® con extracción automática de muestras, a 37 ± 2 °C y con una velocidad de agitación de 300 rpm (Hanson Research Corporation®) (Figura 5.2), utilizando membranas de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μ m y un área de exposición de 1,77 cm² (Sigma Aldrich®, USA). Formulaciones acuosas (0,3 mL) de SMR e INM puras dispersas en SRF (utilizadas como control), de los complejos binarios o ternarios, en relaciones estequiométrica 1:1 o 1:1:1 (ver Capítulo II), o de los fármacos incorporados en ME₁₋₅ (ver Capítulo III); liposomas FC:COL, 1:1; 2:1; 3:1 o FC (ver Capítulo IV); y ME₅ o Liposomas FC:COL 3:1 conteniendo β -CD al 1,8%; M- β -CD al 12%; HP- β -CD al 2,5 % o MEG al 5%, obtenidos mediante la metodología DRV (ver Capítulo IV y V, respectivamente). Las cantidades de los fármacos fueron las correspondientes a las de la dosis oral en 250 mL, manteniéndose concentraciones de 200 μ g/mL. Se utilizó una solución reguladora de fosfatos (SRF) 0,01 M de pH 7,4 como medio de difusión en los compartimento donador y receptor. Las muestras fueron extraídas del compartimento receptor en un volumen de 2 mL a intervalos fijos y el volumen extraído fue remplazado automáticamente con un volumen igual de SRF previamente termostatizado. Las concentraciones de los fármacos fueron determinadas espectrofotométricamente a 240 y 225 nm para SMR e INM, respectivamente. Con el fin de monitorear el cumplimiento de la condición de sumidero durante los experimentos, fue calculada la relación entre la concentración de fármaco en los compartimentos receptor y donador a todos los

tiempos, considerando apropiado un cociente menor a 0,1. Cada ensayo fue realizado al menos por triplicado y los resultados representan el promedio experimental con su la desviación estándar.

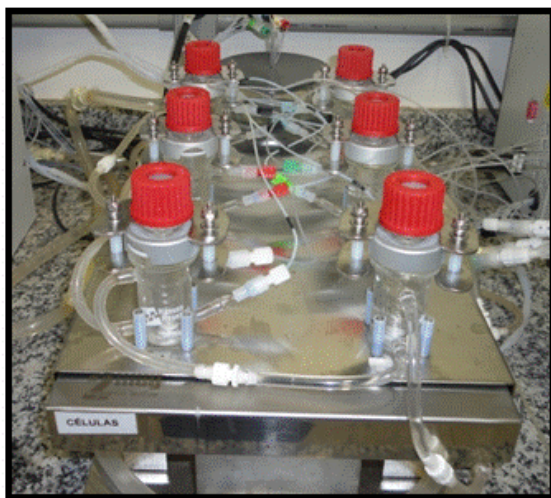


Figura 5.2. Aparato de celdas de difusión de Franz verticales MicroettePlus® con extracción automática utilizado para realizar los ensayos de liberación in vitro.

5.2.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias significativas de los cambios inducidos en la liberación de los IFA, debido a la incorporación en los sistemas de vehiculización, fueron inferidas utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Los resultados fueron considerados estadísticamente diferentes cuando $p < 0,05$.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3. ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Los experimentos de liberación fueron realizados usando de celdas de difusión de Franz verticales con extracción automática de muestras, a 37 ± 2 °C y con una velocidad de agitación de 300 rpm. En todos los casos, los cocientes entre las concentraciones del fármaco en el compartimento receptor y donador, a todos los tiempos, fueron iguales o menores a 0,1, indicando que se mantuvieron las condiciones de sumidero durante todo el procedimiento, así como los valores bajos de desviación estándar demostraron la buena reproducibilidad del método.

5.3.1. LIBERACIÓN DE SMR E INM A PARTIR DE COMPLEJOS BINARIOS CON CD Y MEG

La habilidad de CD y MEG como portadores de SMR e INM y para sostener su liberación fue evaluada. En general, los complejos mostraron una liberación sostenida de los fármacos (Figura 5.3). También, se observó que las formulaciones conteniendo CD o MEG exhibieron una menor difusión a través de la membrana de acetato de celulosa en comparación con los IFA puros. Estos resultados sugieren que SMR e INM fueron receptados por las CD y además, SMR por MEG, para ser luego liberados lentamente. A su vez, las CD y MEG condujeron a una menor liberación en comparación con los fármacos puros. Por este motivo, tanto las CD como MEG permiten una liberación controlada de los fármacos.

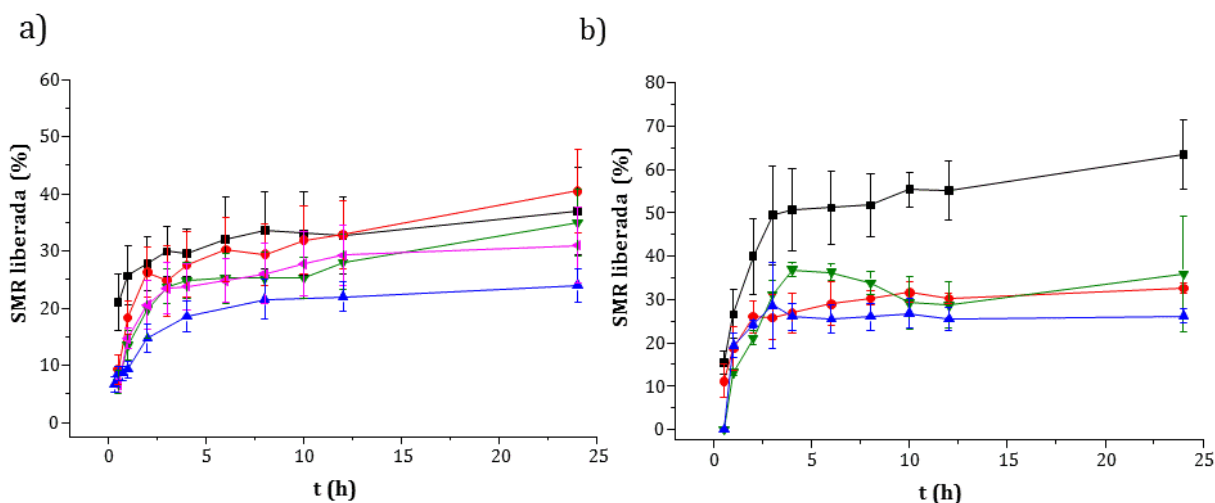


Figura 5.3. Perfiles de liberación *in vitro* de: a) SMR e b) INM, a partir de la formulación control (■); o el complejo binario 1:1 con β -CD (●); M- β -CD (▼); HP- β -CD (▲) o MEG (sólo SMR) (◄); (cada valor representa el promedio \pm S.D. de $n \geq 3$).

5.3.2. LIBERACIÓN DE SMR PARTIR DE COMPLEJOS TERNARIOS CON CD Y MEG

La capacidad de los complejos ternarios de SMR para transportar y sostener la liberación del fármaco fue determinada. El análisis de los resultados presentados en la Figura 5.4 indicó la existencia de un efecto de retención adicional producido por la presencia de MEG en los complejos ternarios con β -CD y M- β -CD, permitiendo una liberación más sostenida que la que presentaron los correspondientes complejos binarios. En contraste, el complejo SMR:HP- β -CD:MEG mostró una difusión apreciablemente mayor comparada con la del complejo SMR:HP- β -CD, proveyendo un incremento en la liberación del fármaco. En la Sección 5.1.4 fueron expuestas diferentes teorías respecto a diferencias en el efecto modulador de la liberación producido por las CD. En base a ello y a los resultados obtenidos, el comportamiento diferente observado para el complejo ternario con HP- β -CD puede ser explicado, tanto por la baja eficiencia de complejación ($K_{CT} = 7 \pm 3 \text{ M}^{-1}$) de SMR con HP- β -CD en SRF de pH 8 (como fue revelado mediante los ASF, en la Sección 2.3.1.1.1.), en comparación con los complejos ternarios con β -CD ($15 \pm 4 \text{ M}^{-1}$) y M- β -CD ($88 \pm 9 \text{ M}^{-1}$), en los cuales se observó un efecto de retención del IFA, sino también por las propiedades hidrofílicas de HP- β -CD que incrementan la actividad termodinámica del fármaco en el sistema y consecuentemente, favorece el transporte del mismo a través de la membrana.

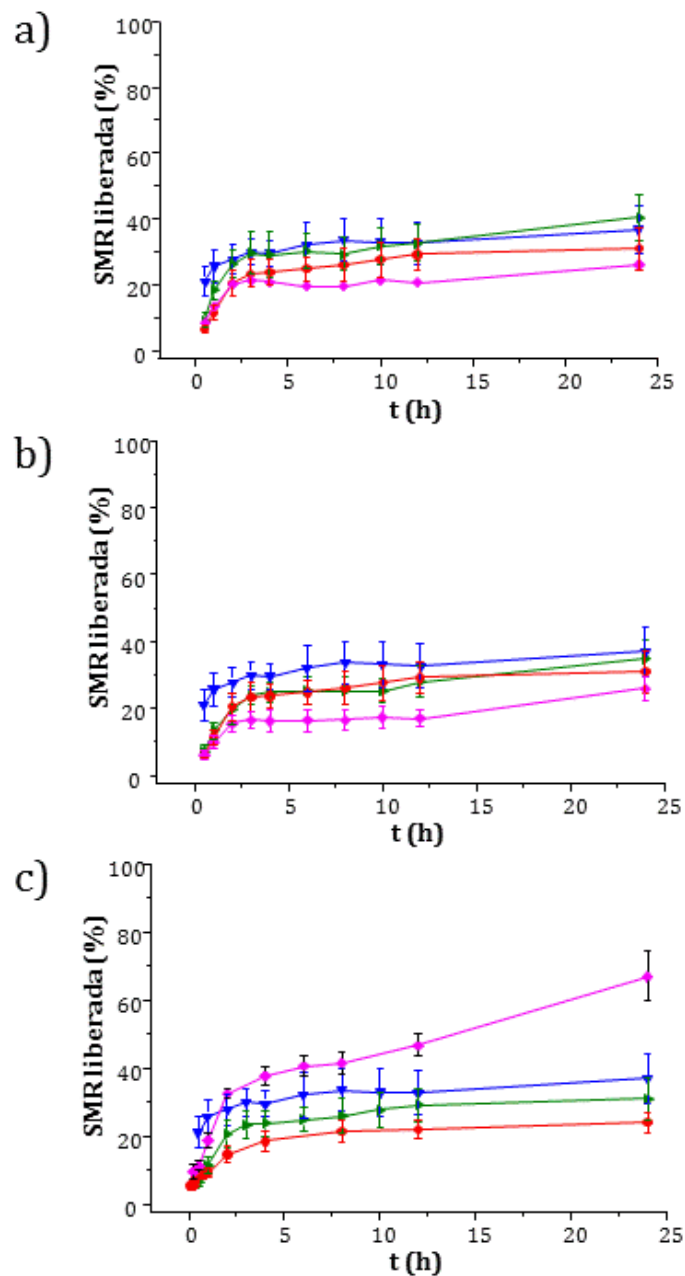


Figura 5.4. Perfiles de liberación *in vitro* de SMR (\blacktriangledown); del sistema SMR:MEG (\bullet); de los complejos binarios SMR:CD (\blacktriangleright); y de los complejos ternarios SMR:CD:MEG (\blacklozenge); para a) β -CD; b) M- β -CD; c) HP- β -CD. (cada valor representa el promedio \pm S.D. de $n \geq 3$).

5.3.3. LIBERACIÓN *IN VITRO* DE SMR E INM A PARTIR DE MICROEMULSIONES

Los perfiles de liberación de SMR e INM a partir de las ME₁₋₅ fueron evaluados mediante la determinación de la difusión a través de la membrana de acetato de celulosa y son presentados en la Figura 5.5. Se observó una apreciable potenciación de la difusión de SMR a partir de las ME 3, 4 y 5, alcanzando un incremento del doble con ME₅ luego de las 4 h. Los perfiles de liberación de INM a partir de las ME fueron similares entre ellos, observándose un ligero efecto de retención con respecto a la formulación control. Estos resultados pueden explicarse mediante las diferencias en los coeficientes de partición de ambos fármacos (ver Sección 3.3.1.4), siendo que INM es altamente hidrofóbica presentó mayor afinidad por la fase oleosa, encontrando mayor impedimento para su liberación. La capacidad de retención de INM en la fase oleosa fue también evidenciada por la mayor incorporación de INM dentro de las ME (Sección 3.3.1.5). Por su parte, el incremento en la difusión de SMR se debe a las propiedades solubilizantes de las ME, ya que se observó que las ME 4 y 5, las cuales contienen los mayores porcentajes de fase oleosa produjeron el mayor porcentaje de liberación de SMR.

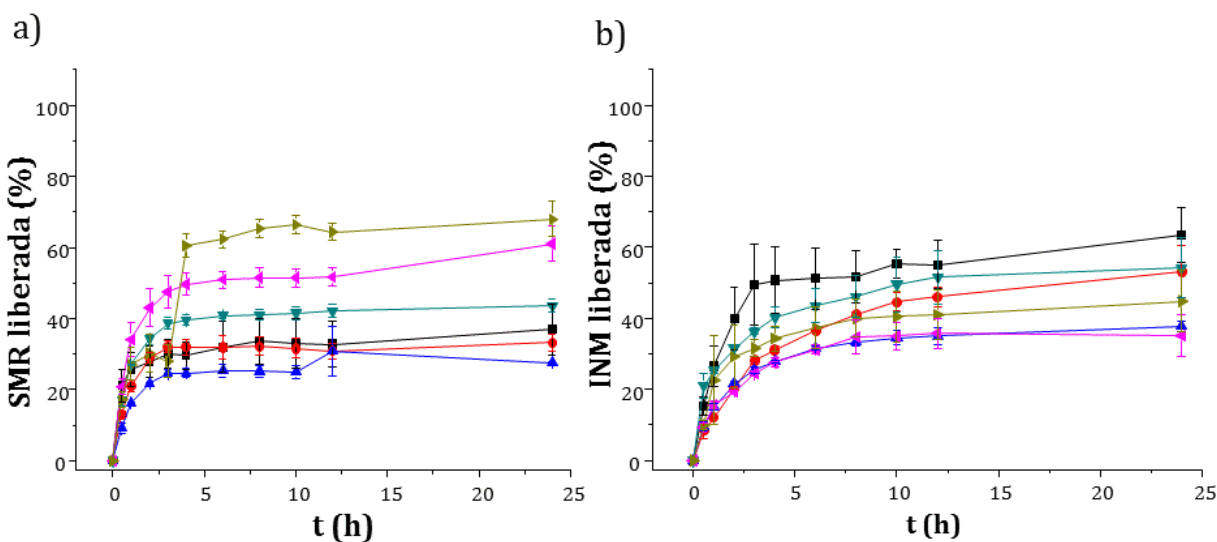


Figura 5.5. Perfiles de liberación *in vitro* de: a) SMR e b) INM, a partir de la formulación control (■); de ME₁ (●); de ME₂ (▲); de ME₃ (▼); de ME₄ (◄) o de ME₅ (►) (cada valor representa el promedio \pm S.D. de $n \geq 3$).

5.3.4. LIBERACIÓN *IN VITRO* DE SMR E INM A PARTIR DE MICROEMULSIONES EN PRESENCIA DE LIGANDOS

La liberación y transporte *in vitro* de SMR e INM a partir de la ME₅ conteniendo soluciones acuosas de β -CD al 1,8%; M- β -CD al 12%; HP- β -CD al 2,5 % o MEG al 5%, incorporados en la fase acuosa de la ME fue estudiada mediante la evaluación de la permeabilidad a través de la membrana artificial (Figura 5.6). En los perfiles de liberación de las ME conteniendo MEG o M- β -CD se observó un apreciable incremento de la cantidad liberada de los fármacos, obteniéndose valores de 100% y 90% y alcanzando un amesetamiento a las 2 y 10 h, para las ME conteniendo SMR o INM,

respectivamente, lo que podría deberse al efecto solubilizador de los ligandos que aumentan la actividad termodinámica de los IFA y facilitan la penetración de la droga a través de la capa estática de agua adyacente a la membrana. Los resultados indicaron que el efecto combinado de ME con CD, principalmente con M- β -CD, o con MEG, producen una liberación más rápida de los fármacos hidrofóbicos, acelerando su difusión a través de la capa estática de agua adyacente a las membranas.

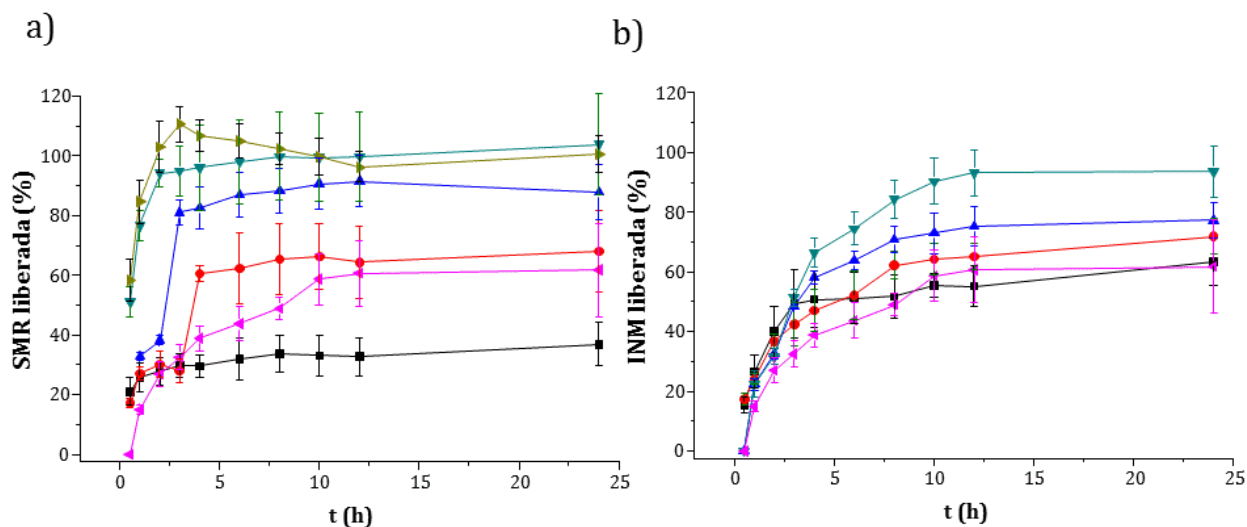


Figura 5.6. Perfiles de liberación *in vitro* de: a) SMR e b) INM, a partir de la formulación control (■); ME₅ en ausencia de ligandos (●); ME₅ conteniendo β -CD (▲); M- β -CD (▼); HP- β -CD (◄); o MEG (sólo SMR) (►) incorporados en la fase acuosa (cada valor representa el promedio \pm S.D. de $n \geq 3$).

5.3.5. LIBERACIÓN *IN VITRO* DE SMR E INM A PARTIR DE LIPOSOMAS

La capacidad de los liposomas para transportar y liberar los IFA fue evaluada a partir de la determinación de la difusión de los fármacos contenidos en liposomas FC:COL, 1:1; 2:1; 3:1 y FC suspendidos en SRF de pH 7,4, a través de una membrana de acetato de celulosa a 37 °C. Los perfiles de liberación de ambos IFA, incluidos en los diferentes liposomas, fueron similares entre ellos, observándose un fuerte efecto de retención con respecto a la formulación control, indicando que los sistemas evaluados permiten la liberación sostenida de ambos IFA, independientemente de la proporción de FC y COL utilizada.

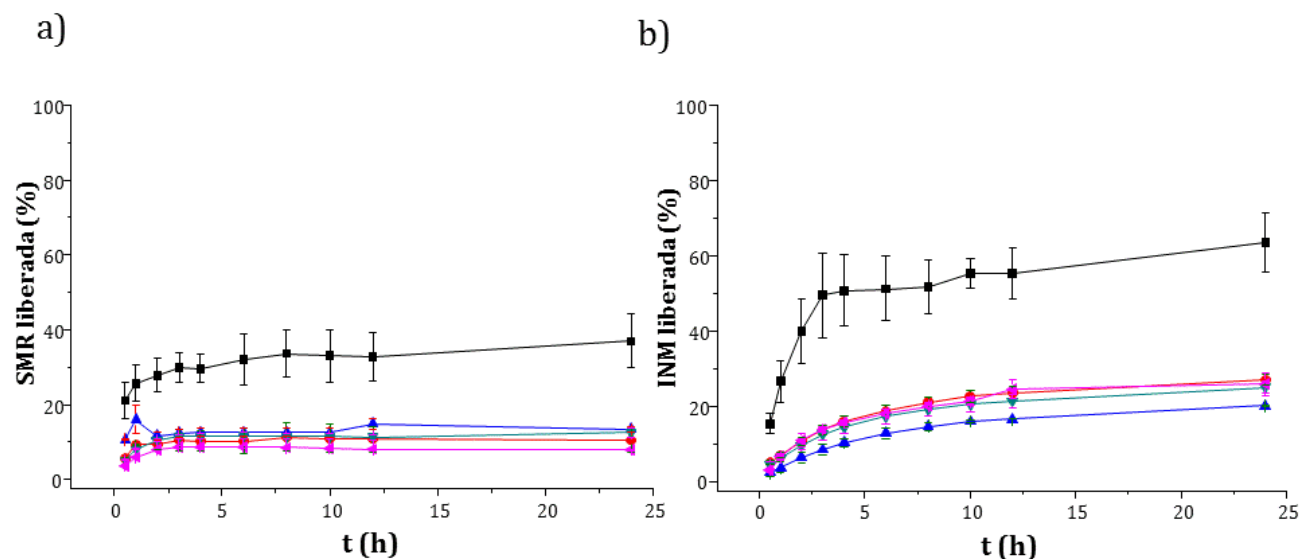


Figura 5.7. Perfiles de liberación *in vitro* de: a) SMR e b) INM, a partir de la formulación control (■); de LIP FC:COL 1:1 (●); FC:COL 2:1 (▲); FC:COL 3:1 (▼); FC (◄) (cada valor representa el promedio \pm S.D. de $n \geq 3$).

5.3.6. LIBERACIÓN *IN VITRO* DE SMR E INM A PARTIR DE LIPOSOMAS EN PRESENCIA DE LIGANDOS

La liberación y transporte *in vitro* de SMR e INM a partir de liposomas FC:COL 3:1, en presencia de soluciones acuosas de β -CD al 1,8%; M- β -CD al 12%; HP- β -CD al 2,5 % o MEG al 5% fue estudiada mediante la evaluación de la difusión a través de una membrana sintética (Figura 5.8). Los liposomas conteniendo SMR, en presencia de las CD menos hidrofílicas (β -CD y M- β -CD), presentaron un comportamiento similar al de la formulación en ausencia de ligandos, observándose un efecto de retención de 0 a 6 h respecto a esta última. Del mismo modo, los liposomas conteniendo INM, en presencia de las tres CD, exhibieron un fuerte efecto de retención en comparación con el sistema de liposomas FC:COL 3:1 sin ligandos. Por otro lado, los perfiles de liberación de SMR a partir de los liposomas conteniendo HP- β -CD o MEG presentaron mayores porcentajes de liberación del fármaco, alcanzando valores cercanos al 40% a las 6 h. Estos resultados concuerdan con los observados para los complejos binarios de ambos IFA y ternarios de SMR con estas CD, indicando una fuerte influencia de los ligandos sobre la liberación de los fármacos vehiculizados en este tipo de sistemas.

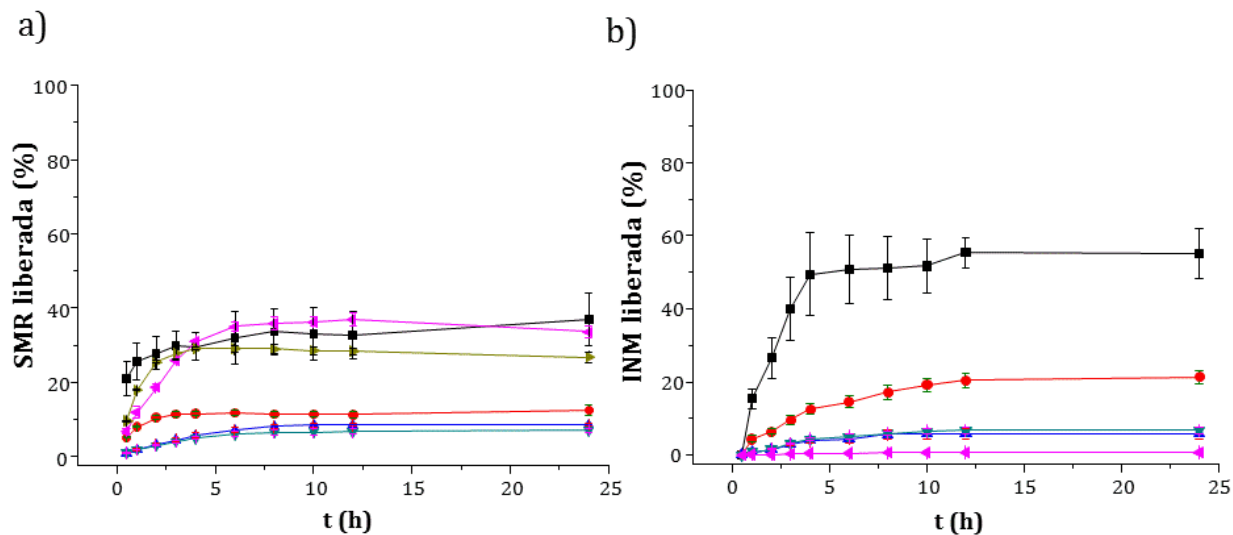


Figura 5.8. Perfiles de liberación *in vitro* de: a) SMR e b) INM, a partir de la formulación control (■); de Liposomas FC:COL 3:1 en ausencia de ligandos (●); conteniendo β -CD (▲); M- β -CD (▼); HP- β -CD (◄); o MEG (sólo SMR) (►) incorporados en la fase acuosa (cada valor representa el promedio \pm S.D. de $n \geq 3$).

5.4. CONCLUSIONES PARCIALES

Los estudios de liberación *in vitro* demostraron que los complejos binarios con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG produjeron una disminución en la tasa de transporte a través de la membrana de acetato de celulosa, permitiendo la liberación sostenida de los fármacos. Los sistemas ternarios con β -CD y M- β -CD produjeron un efecto de retención adicional, mientras que el sistema ternario con HP- β -CD y MEG incrementó apreciablemente la liberación de SMR, mostrando que los complejos ternarios fueron superiores a los binarios en términos de modulación de la liberación.

Por otro lado, las ME fueron capaces de incrementar el índice de liberación de SMR, observándose una gran ventaja de la estrategia de combinación de CD o MEG con ME, ya que la presencia de MEG, β -CD y M- β -CD incrementó significativamente la cantidad de los fármacos liberada alcanzando valores del 95 al 100%, lo que se debe al aumento de solubilidad producido por los ligandos, que facilita la penetración del fármaco a través de la capa estática de agua. Los liposomas FC:COL produjeron un fuerte efecto de retención de los IFA permitiendo la liberación sostenida de los mismos. Por otro lado, los efectos de los ligandos presentes en los liposomas FC:COL 3:1, sobre la liberación de los fármacos, concuerdan con los observados para los correspondientes complejos binarios, indicando una fuerte influencia de los mismos sobre la liberación de los IFA vehiculizados en liposomas.

Considerando que en la terapéutica, en algunas ocasiones, puede requerirse un efecto de retención en la liberación del IFA y, en otras, el aumento de esta última, es importante destacar que las estrategias de formulación estudiadas otorgan robustez para la modulación de la liberación de los fármacos. De esta manera, las formulaciones estudiadas demostraron ser promisorias para aumentar la biodisponibilidad de fármacos, con un costo accesible y facilidad de preparación, permitiendo la vehiculización de IFA escasamente solubles en agua.

5.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rocha e Silva H. Sistemas nanoestructurados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra dermatomicoses. Tesis Doctoral. 2011;
2. Klimundová J, Šatinský D, Sklenářová H, Solich P, Satinský D, Sklenářová H, et al. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. *Talanta* 2006;69:730–5.
3. Markoutsas E, Pampalakis G, Niarakis A, Romero I a., Weksler B, Couraud PO, et al. Uptake and permeability studies of BBB-targeting immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;77:265–74.
4. Skouras A, Mourtas S, Markoutsas E, De Goltstein MC, Wallon C, Catoen S, et al. Magnetoliposomes with high USPIO entrapping efficiency, stability and magnetic properties. *Nanomed Nanotech Biol Med* 2011;7:572–9.
5. Manca ML, Mourtas S, Dracopoulos V, Fadda AM, Antimisiaris SG. PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery?. A comparative study of particle stability during nebulization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2008;62:220–31.
6. Matsuda H, Arima H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;36:81–99.
7. Sermkaew N, Ketjinda W, Boonme P, Phadoongsombut N, Wiwattanapatapee R. Liquid and solid self-microemulsifying drug delivery systems for improving the oral bioavailability of andrographolide from a crude extract of *Andrographis paniculata*. *Eur J Pharm Sci* 2013;50:459–66.
8. Chen Y, Lu Y, Chen J, Lai J, Sun J, Hu F, et al. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. *Int J Pharm* 2009;376:153–60.
9. Taupitz T, Dressman JB, Buchanan CM, Klein S. Cyclodextrin-water soluble polymer ternary complexes enhance the solubility and dissolution behaviour of poorly soluble drugs . Case example : Itraconazole. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;83:378–87.
10. Tomono K, Gotoh H, Okamura M, Horioka M, Ueda H, Nagai T. Effect of β -cyclodextrins on sustained release of nitroglycerin from ointment bases. *Yakuzaigaku* 1991;51:22–8.
11. Sun L, Zhang W, Liu X, Sun J. Preparation and evaluation of sustained-release azithromycin tablets *in vitro* and *in vivo*. *Asian J Pharm Sci* 2014;9:155–61.
12. Natarajan J V., Nugraha C, Ng XW, Venkatraman S. Sustained-release from Nanocarriers: A review. *J Control Release* 2014;:DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.029.

13. Li B, Brown K V, Wenke JC, Guelcher SA. Sustained release of vancomycin from polyurethane scaffolds inhibits infection of bone wounds in a rat femoral segmental defect model. *J Control Release* 2010;145:221–30.
14. Chakravarthi SS, De S, Miller DW, Robinson DH. Comparison of anti-tumor efficacy of paclitaxel delivered in nano- and microparticles. *Int J Pharm* 2010;383:37–44.
15. Lin Z, Gao W, Hu H, Ma K, He B, Dai W, et al. Novel thermo-sensitive hydrogel system with paclitaxel nanocrystals: High drug-loading, sustained drug release and extended local retention guaranteeing better efficacy and lower toxicity. *J Control Release* 2014;174:161–70.
16. Choudhury H, Gorain B, Karmakar S, Biswas E, Dey G, Barik R, et al. Improvement of cellular uptake, *in vitro* antitumor activity and sustained release profile with increased bioavailability from a nanoemulsion platform. *Int J Pharm* 2014;460:131–43.
17. Kwaka H-H, Shimb W-S, Sona M-K, Kim Y-J, Kim T-H, Youn H-J, et al. Efficacy of a new sustained-release microsphere formulation of exenatide, DA-3091, in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Eur J Pharm Sci* 2010;40:103–9.
18. Gandhi R, Kaul CL, Panchagnula R. Pharmacokinetic evaluation of an azithromycin controlled release dosage form in healthy human volunteers: a single dose study. *Int J Pharm* 2004;270:1–8.
19. Másson M, Loftsson T, Másson G, Stefánsson E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and *in vitro* testing. *J Control Release* 1999;59:107–18.
20. Xin J, Guo Z, Chen X, Jiang W, Li J, Li M. Study of branched cationic β -cyclodextrin polymer / indomethacin complex and its release profile from alginate hydrogel. *Int J Pharm* 2010;386:221–8.
21. Constantin M, Bucatariu S, Harabagiu V, Ascenzi P, Fundueanu G. Do cyclodextrins bound to dextran microspheres act as sustained delivery systems of drugs? *Int J Pharm* 2014;
22. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:645–66.
23. Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2006;329:1–11.
24. Umemura M, Ueda H, Tomono K, Nagai T. Effect of diethyl- β -cyclodextrin on the release of nitroglycerin from formulations. *Drug Des Deliv* 1990;6:291–310.
25. Higashi T, Hirayama F, Arima H, Uekama K. Polypseudorotaxanes of pegylated insulin with cyclodextrins: application to sustained release system. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:1871–4.
26. Fernandes C. Hydrophilic and hydrophobic cyclodextrins in a new sustained release oral formulation of nifedipine: *in vitro* evaluation and bioavailability studies in rabbits. *J Control Release* 2003;88:127–34.

27. Tarsa PB, Towler CS, Woollam G, Berghausen J. The influence of aqueous content in small scale salt screening - Improving hit rate for weakly basic, low solubility drugs. *Eur J Pharm Sci* 2010;41:23–30.
28. Serajuddin ATM. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:603–16.
29. Frézard F, Martins PS, Bahia APCO, Le Moyec L, de Melo AL, Pimenta AMC, et al. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ β -cyclodextrin nanoassemblies. *Int J Pharm* 2008;347:102–8.
30. Chadha R, Gupta S, Shukla G, Jain DVS. Interaction of artesunate with β -cyclodextrin: Characterization, thermodynamic parameters, molecular modeling, effect of PEG on complexation and antimalarial activity. *Results Pharma Sci* 2011;1:38–48.
31. Gupta P, Bansal AK. Modeling of drug release from celecoxib-PVP-meglumine amorphous system. *PDA J Pharm Sci Technol* 2005;59:346–54.
32. Tran TT, Tran PH, Lee B. Dissolution-modulating mechanism of alkalizers and polymers in a nanoemulsifying solid dispersion containing ionizable and poorly water-soluble drug. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72:83–90.
33. Ribeiro L, Ferreira D, Veiga F. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *Eur J Pharm Sci* 2003;20:253–66.
34. Garnero C, Longhi M. Study of ascorbic acid interaction with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triethanolamine, separately and in combination. *J Pharm Biomed* 2007;45:536–45.
35. Mura P, Maestrelli F, Cirri M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and aminoacids. *Int J Pharm* 2003;260:293–302.
36. Barillaro V, Dive G, Bertholet P, Evrard B, Delattre L, Frederich M, et al. Theoretical and experimental investigations of organic acids / cyclodextrin complexes and their consequences upon the formation of miconazole / cyclodextrin / acid ternary inclusion complexes. *Int J Pharm* 2007;347:62–70.
37. Granero GE, Maitre MM, Garnero C, Longhi MR. Synthesis, characterization and *in vitro* release studies of a new acetazolamide-HP- β -CD-TEA inclusion complex. *Eur J Med Chem* 2008;43:464–70.
38. Sajeesh S, Bouchemal K, Marsaud V, Vauthier C, Sharma CP. Cyclodextrin complexed insulin encapsulated hydrogel microparticles: An oral delivery system for insulin. *J Control Release* 2010;147:377–84.
39. Jablan J, Szalontai G, Jug M. Comparative analysis of zaleplon complexation with cyclodextrins and hydrophilic polymers in solution and in solid state. *J Pharm Biomed Anal* 2012;71:35–44.
40. Trotta M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. *J Control Release* 1999;60:399–405.

41. Kalaitzaki A, Pouloupoulou M, Xenakis A, Papadimitriou V. Surfactant-rich biocompatible microemulsions as effective carriers of methylxanthine drugs. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2014;442:80–7.
42. Li G, Fan Y, Li X, Wang X, Li Y, Liu Y, et al. In vitro and *in vivo* evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. *Int J Pharm* 2012;425:53–61.
43. Lv F, Zheng L, Tung C. Phase behavior of the microemulsions and the stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system. *Int J Pharm* 2005;301:237–46.
44. Dai J, Kim SM, Shin I-S, Kim JD, Lee HY, Shin WC, et al. Preparation and stability of fucoxanthin-loaded microemulsions. *J Ind Eng Chem* 2014;20:2103–10.
45. Fatouros DG, Klepetsanis P, Ioannou P V., Antimisiaris SG. The effect of pH on the electrophoretic behaviour of a new class of liposomes: Arsonoliposomes. *Int J Pharm* 2005;288:151–6.
46. Kallinteri P, Antimisiaris SG, Karnabatidis D, Kalogeropoulou C, Tsota I, Siablis D. Dexamethasone incorporating liposomes: An *in vitro* study of their applicability as a slow releasing delivery system of dexamethasone from covered metallic stents. *Biomaterials* 2002;23:4819–26.
47. Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L. Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int J Pharm* 2007;338:35–42.
48. Kastellorizios M, Michanetzis GP a K, Pistillo BR, Mourtas S, Klepetsanis P, Favia P, et al. Haemocompatibility improvement of metallic surfaces by covalent immobilization of heparin-liposomes. *Int J Pharm* 2012;432:91–8.
49. Iu CL, Hang FC. Development and Characterization of Eucalyptol Microemulsions for Topic Delivery of Curcumin. *Chem Pharm Bull* 2011;59:172–8.
50. Taylor P, Fanun M. Solubilization of Azithromycin in Microemulsions Based on Mixed Nonionic Surfactants and Mixed Oils Solubilization of Azithromycin in Microemulsions Based on Mixed Nonionic Surfactants and Mixed Oils. *JDisper Sci Technol* 2012;33:185–90.
51. Nornoo AO, Chow DS-L. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel: II. Stability, *in vitro* release and pharmacokinetics. *Int J Pharm* 2008;349:117–23.
52. Montenegro L, Carbone C, Puglisi G. Vehicle effects on *in vitro* release and skin permeation of octylmethoxycinnamate from microemulsions. *Int J Pharm* 2011;405:162–8.
53. Padula C, Nicoli S, Santi P. Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin. *Int J Pharm* 2009;372:12–6.
54. Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int J Pharm* 1998;165:129–68.

55. Villafuerte-Robles L. Nanotecnología Farmacéutica. Razón y Palabra 2009;68:1–20.
56. Tsukamoto T, Hironaka K, Fujisawa T, Yamaguchi D, Tahara K, Tozuka Y, et al. Preparation of bromfenac-loaded liposomes modified with chitosan for ophthalmic drug delivery and evaluation of physicochemical properties and drug release profile. Asian J Pharm Sci 2013;8:104–9.
57. Crielaard BJ, van der Wal S, Le HT, Bode ATL, Lammers T, Hennink WE, et al. Liposomes as carriers for colchicine-derived prodrugs: vascular disrupting nanomedicines with tailorable drug release kinetics. Eur J Pharm Sci 2012;45:429–35.
58. Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and *in vivo* evaluation of benzocaine-loaded liposomes. Eur J Pharm Biopharm 2007;67:86–95.
59. Dalmora MEA, Oliveira AG. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. Int J Pharm 1999;184:157–64.
60. Dalmora MEA, Oliveira AG, Dalmora SL. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and *in vivo* topical anti-inflammatory effect. Int J Pharm 2001;222:45–55.
61. Richter T, Keipert S. In vitro permeation studies comparing bovine nasal mucosa, porcine cornea and artificial membrane: androstenedione in microemulsions and their components. Eur J Pharm Biopharm 2004;58:137–43.
62. Hatzi P, Mourtas S, G. Klepetsanis P, Antimisiaris SG. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. Int J Pharm 2007;333:167–76.
63. Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L. Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. Int J Pharm 2006;312:75–82.
64. Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. Int J Pharm [Internet] 2006 [Last access: 2014 May 26];312:53–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469460>
65. Fatouros DG, Hatzidimitriou K, Antimisiaris SG. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. Eur J Pharm Sci 2001;13:287–96.

CAPÍTULO VI:

**ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD
A TRAVÉS DE MEMBRANAS
ARTIFICIALES**

6.1. INTRODUCCIÓN

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) es un lineamiento científico para la clasificación de fármacos en base a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal, los cuales son factores fundamentales que afectan la biodisponibilidad oral de fármacos.¹ El objetivo del presente capítulo fue desarrollar un método rápido, eficaz, reproducible y de bajo costo para la predicción apropiada de la permeabilidad de fármacos con características estructurales diversas y que son absorbidos por un mecanismo de difusión pasiva, que facilite la evaluación del comportamiento que tendrá un producto farmacéutico de acuerdo al SCB. Para ello, se realizaron ensayos de permeación utilizando celdas de Franz horizontales bicompartimentales, empleando una membrana artificial bio-mimética. Además, el experimento fue llevado a cabo con 14 fármacos, de los cuales se conocen los datos de fracción de dosis absorbida en humanos (Fa%), para establecer una correlación entre los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) obtenidos experimentalmente, así como de los Fa% determinados *in vivo*, con la finalidad de evaluar la aplicabilidad y eficacia del método para la predicción de la permeabilidad de fármacos que son absorbidos por un mecanismo de difusión pasiva. Posteriormente, se evaluó la permeabilidad de SMR e INM con el objetivo de clasificar estos fármacos de acuerdo al SCB, y a partir de ello, se evaluó el efecto de los complejos binarios y ternarios, de microemulsiones y liposomas, previamente estudiados, sobre la permeabilidad de los mismos.

6.1.1. PERMEABILIDAD INTESTINAL DE FÁRMACOS

La determinación de la permeabilidad intestinal de IFA ha sido extensamente utilizada, ya que constituye uno de los principales factores que gobiernan tanto la tasa como la extensión de la absorción en humanos (F_{abs}) de los mismos tras la administración oral. Numerosas investigaciones científicas han establecido la existencia de una buena correlación entre la permeabilidad en yeyuno humano (P_{eff}), determinada utilizando técnicas de perfusión intestinal de paso simple y la fracción de dosis absorbida, a partir de una formulación de liberación inmediata, de disolución rápida. La mejor forma de determinar la F_{abs} son los estudios farmacocinéticos de balance de masa, los cuales presentan alta complejidad y alto costo, debido a que requieren ingredientes farmacológicamente activos radiomarcados.

6.1.2. DIFUSIÓN DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

La membrana celular es una estructura anfipática, compuesta fundamentalmente por una bicapa lipídica y proteínas (Figura 6.1). Las tres clases principales de lípidos anfipáticos que la componen son: fosfolípidos, glicolípidos y esteroides. La proporción de cada uno depende del tipo de célula pero, en general, los fosfolípidos son los más abundantes, siendo fosfatidilcolina un componente fundamental. La disposición de las cabezas polares hidrofílicas y las colas apolares hidrofóbicas de los fosfolípidos, dentro de la bicapa lipídica, previene la difusión a través de la membrana de solutos

polares tales como aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y iones y, en general, permite la difusión pasiva de moléculas hidrofóbicas.²

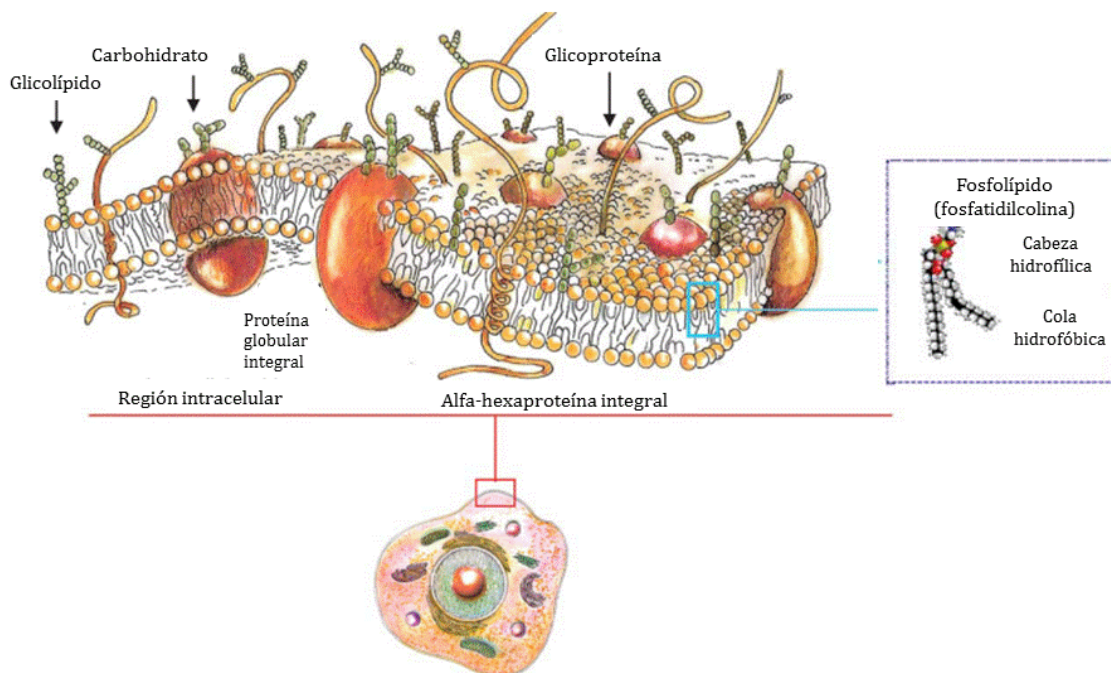


Figura 6.1. Estructura de la membrana celular.

La bicapa fosfolipídica, que posee en su estructura proteínas de membrana específicas, permite la permeabilidad selectiva de moléculas mediante mecanismos de transporte pasivo y activo.

Cuando el movimiento de sustancias a través de la membrana sucede por medio de un equilibrio químico o eléctrico, transcurre sin requerimientos de energía, pudiendo ocurrir por medio de transporte pasivo, tal como una simple difusión vía gradientes (vía transcelular o paracelular), o mediante difusión facilitada, mediada por proteínas transportadoras. En otros casos, es necesario el movimiento de sustancias en contra del gradiente químico o eléctrico para mantener las concentraciones apropiadas dentro de la célula o de las organelas. Este tipo de transporte requiere de energía. Las células utilizan dos tipos de transporte activo, que requieren energía en forma directa o indirecta, mediante el uso de ATP (Figura 6.2).² A su vez, la difusión pasiva de IFA es impulsada por concentraciones abundantes del mismo en el exterior acuoso de la membrana o en el vehículo acuoso del fármaco.³ Las formulaciones galénicas pueden optimizar la solubilidad de un fármaco o mejorar la permeabilidad a través de membranas, incrementando así la biodisponibilidad del mismo.⁴⁻⁹

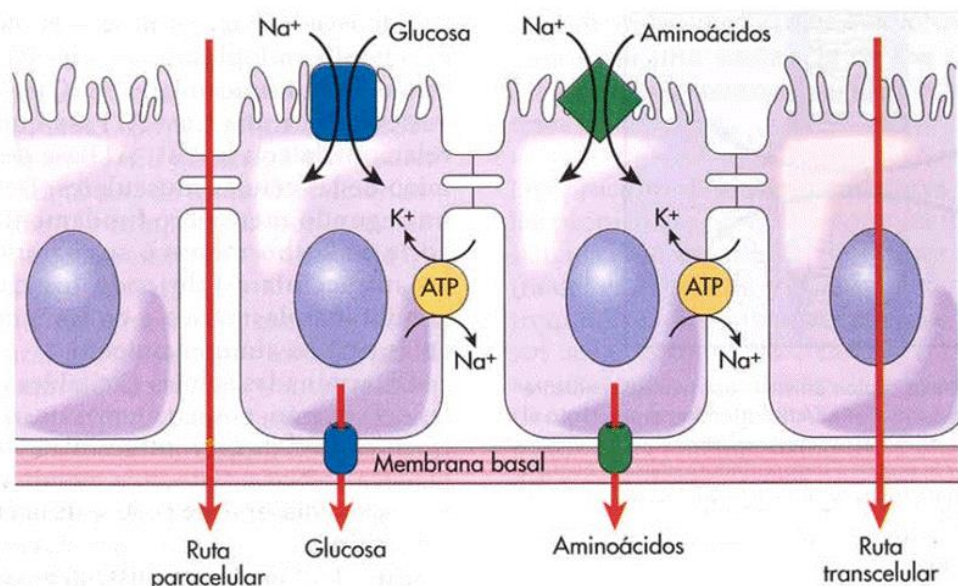


Figura 6.2. Mecanismos de transporte celular

La base fundamental del SCB es la aplicación de la primera ley de Fick, para el transporte a través de una membrana, la cual establece que el flujo de un fármaco (masa/área/tiempo), a través de la pared intestinal, es igual a la permeabilidad por la concentración del IFA sobre la superficie de la membrana. En términos generales, la misma se relaciona con el balance de masa local que debe ocurrir para la absorción de fármacos, el cual es pertinente a cada punto a lo largo de la membrana intestinal. La permeabilidad, en general, depende de la posición y del tiempo, y su dependencia está dada por la concentración del IFA.

La predicción teórica de la extensión de la absorción puede llevarse a cabo, en base a este balance de masa, resultando en la siguiente ecuación:¹⁰

$$F_{\text{abs}} = (\text{dosis}^{-1}) \int_0^{t_{\text{res}}} \int \int_A P_{\text{eff}} C \, dA \, dt$$

donde t_{res} es el tiempo de residencia del fármaco en el lumen intestinal; A es el área de la membrana intestinal; P_{eff} es la permeabilidad efectiva del fármaco a través de la membrana; C es la concentración del fármaco en el lumen intestinal; y t es el tiempo.

En un experimento predictivo de la permeabilidad de un IFA es importante proveer condiciones de sumidero durante el experimento, a fin de evitar efectos artificiales de saturación. La condición de sumidero se cumple cuando la concentración del fármaco en el medio liberado, no excede el 10% de la solubilidad del mismo en este medio, bajo las condiciones experimentales a un tiempo dado.¹¹

6.1.3. MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE FÁRMACOS

La absorción intestinal de IFA es esencial para el éxito terapéutico de productos farmacéuticos que son administrados por vía oral. Con el creciente descubrimiento de nuevas entidades químicas farmacológicamente activas ha surgido la necesidad de métodos fiables de screening para la rápida evaluación y predicción de las propiedades biofarmacéuticas de dichas moléculas en etapas tempranas de desarrollo.¹² Los métodos para la determinación de absorción pueden ser modelos *in situ*,^{4,13,14} *in vivo*,¹⁵⁻¹⁷ *in silico*,¹⁷⁻¹⁹ o *in vitro*,²⁰⁻²³ utilizados solos o en combinación. A pesar de que la utilización de modelos *in vivo* resulta más eficaz para predecir la absorción intestinal de fármacos, los mismos no son capaces de satisfacer los requerimientos productivos de las industrias en términos de estabilidad y productividad.² Un método *in vitro*, ampliamente utilizado para evaluar la absorción intestinal de IFA, es la utilización de cultivos de monocapas de células Caco-2,^{6,24-27} el cual presenta la ventaja de que contempla tanto el transporte pasivo como el transporte activo. En contraste, la utilización de células Caco-2 es laboriosa y difícilmente puede aplicarse para screening de alto rendimiento.²⁸ Las técnicas *in silico*, basadas puramente en cálculos computacionales de ciertas propiedades físico-químicas de moléculas activas para estimar su potencial de absorción, resultan atractivas, pero su poder de predicción en la actualidad es insatisfactorio.¹²

Dado que la mayoría de las moléculas activas son absorbidas principalmente mediante transporte pasivo, el uso de membranas artificiales, que imiten las membranas biológicas, ofrece una estrategia de alto rendimiento y efectividad para establecer el potencial de absorción de un fármaco que es absorbido por este mecanismo.¹³ El ensayo de permeabilidad de membranas artificiales paralelas [Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA)] fue desarrollado para la determinación rápida de la permeabilidad pasiva de moléculas a través de una membrana (Kansy et al., 1998).²⁹ PAMPA consiste en filtros hidrofóbicos, cubiertos de lecitina en una solución de solvente orgánico, siendo completamente artificial, sin poros ni sistemas de transporte activo.^{28,29} La técnica ha recibido considerable atención en la industria farmacéutica debido a que ofrece una determinación fisicoquímica simple de la permeabilidad de IFA con un bajo costo y un alto rendimiento.^{8,30} Sin embargo, PAMPA presenta la desventaja de la imposibilidad de mantener las condiciones de sumidero durante los experimentos de permeación, debido al escaso volumen de los compartimentos donores y receptores.¹² El ensayo de permeabilidad utilizando celdas de difusión de Franz es uno de los métodos más comúnmente utilizados.^{10,15} por lo que constituye una técnica simple, rápida y útil para predecir la absorción oral de fármacos con buena reproducibilidad y bajo costo, si es utilizado junto con una membrana artificial bio-mimética apropiada. Además, el uso de celdas de Franz presenta la ventaja de que la temperatura puede ser controlada y los compartimentos donador y receptor presentan mayor volumen en comparación con PAMPA, así como también es posible mantener las soluciones donora y receptora bajo agitación continua, permitiendo la conservación de las condiciones de sumidero durante el experimento de permeación. Además, para evaluar la confiabilidad de un método predictivo de absorción *in vitro*, es posible realizar una correlación *in vivo-in vitro*.^{8,12,29,31} Por estos motivos, este método puede constituir una técnica de rutina para el control de calidad de productos farmacéuticos en términos de su absorción oral, contribuyendo a reducir y/o reemplazar el uso de animales en investigación.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. MATERIALES

Antipirina, atenolol, alopurinol, verapamilo, ketoprofeno, propranolol, cloranfenicol, hidroclorotiazida, furosemida, naproxeno, sulfamerazina e indometacina fueron adquiridos de Parafarm®, Argentina. Aciclovir fue obtenido de ELEA®, Argentina y Cafeína, Teofilina y carbamazepina fueron obtenidos de Unifarma®, Argentina. Meglumina, Lipoid ® S100 y Colesterol fueron proporcionado por Sigma Aldrich®, USA; β -CD (PM = 1135), M- β -CD (PM = 1190) e HP- β -CD (PM = 1325) fueron cordialmente donador por Ferromet® (agente en Argentina de Roquette®). Todos los materiales y solventes utilizados fueron de grado analítico. El agua purificada fue obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Milli-Q.

6.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.2.2.1. ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD *IN VITRO*

Los experimentos de permeación fueron llevados a cabo utilizando celdas de difusión de Franz bicompartimentales, con un área de difusión activa de 1,44 cm² (Figura 6.3). Con el propósito de imitar las propiedades lipofílicas de las membranas biológicas, fueron utilizadas membranas de éster de celulosa de 0,45 μ m (Gamafilm S.A., Argentina) como soporte, las cuales fueron impregnadas por inmersión durante 30 min, con una solución al 10% w/w de 80% de Lipoid ® S100 y 20% de Colesterol, dispersos en 2 mL de n-octanol (Tabla 6.1) y posteriormente fueron montadas entre el compartimento donador y receptor.

Tabla 6.1. Composición de la membrana artificial utilizada en los estudios de permeabilidad.

n-octanol (%):	90		
Lípidos (%):	10	Colesterol (%):	20
		Lipoid S100 (%):	80

Ambas fases fueron termostatzadas a $37,0 \pm 0,5$ °C a ambos lados de la celda de difusión, a través de un baño de circulación. Se utilizó una solución reguladora de fosfatos (SRF) 0,01 M de pH 7,4 como el medio de difusión en las celdas donora y receptora. Los fármacos, suspendidos en la SRF en una concentración equivalente a la mayor dosis ³² (Tabla 6.2) en 250 mL, fueron introducidos en el compartimento donador. Las soluciones dentro de los compartimentos fueron sometidas a agitación mecánica a 14000 rpm (Auto Science®). Las muestras (2 mL) fueron extraídas del compartimento receptor a intervalos de tiempo fijos, restituyendo el volumen extraído con SRF previamente termostatzada.

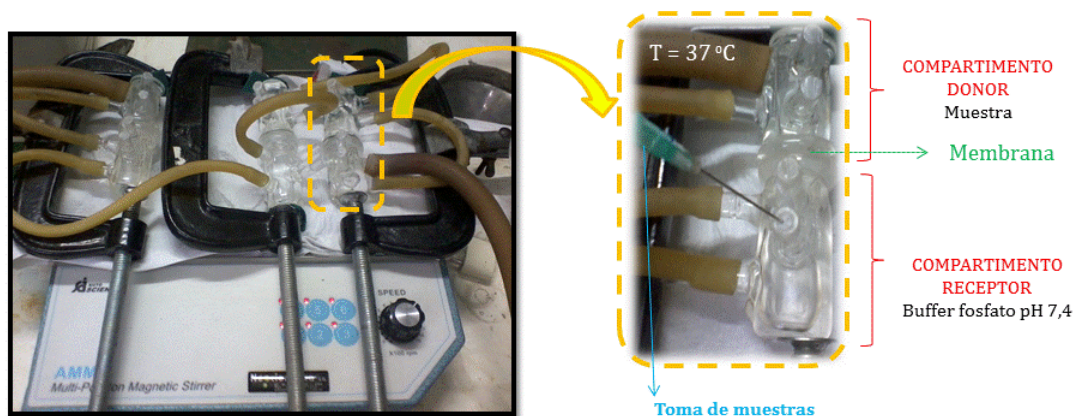


Figura 6.3. Sistema utilizado para la determinación de la permeabilidad utilizando celdas de Franz bicompartmentales.

Las concentraciones de los IFA fueron determinadas espectrofotométricamente a longitudes de onda específicas (Tabla 6.2), utilizando un espectrofotómetro UV visible Agilent Technologies ® Cary 60. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

Con el fin de monitorear el cumplimiento de la condición de sumidero durante los experimentos, fue calculada la relación entre la concentración de fármaco en los compartimentos receptor y donador a todos los tiempos, considerando apropiado un cociente menor a 0,1. Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) fueron calculados, a partir de la pendiente de la porción lineal inicial de los perfiles de permeación, de acuerdo a la siguiente ecuación, la cual deriva de la primera Ley de Fick:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V}{A \cdot C_0 \cdot 60} \quad (1)$$

donde dQ/dt es la cantidad acumulativa de IFA permeado en función del tiempo (mg/min), V es el volumen del compartimento receptor, A es el área de superficie de la membrana, C_0 es la concentración inicial de fármaco en el compartimento donador y 60 es el factor de conversión de minutos a segundos.

Tabla 6.2. Longitudes de onda (nm), mayores dosis orales (mg), coeficientes de permeabilidad aparentes (P_{app}), fracciones absorbidas (Fa%), pKa, porcentajes de ionización (%), carga y clasificación de acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) de los fármacos seleccionados para la validación de la membrana.

Fármaco	Longitud de onda (nm)	Mayor dosis oral(mg) ^a	P_{app} ($\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	%Fa	pKa	Ionización % ^d	Carga	Permeabilidad
Aciclovir	254	500	0,082 ± 0,006	30	2,3;9,3	1,24	0	baja
Atenolol	274	100	0,29 ± 0,05	52	9,6	99,37	+	baja
Furosemida	277	55	0,90 ± 0,06	55	3,9	99,97	-	baja
Hidroclorotiazida	276	2000	1,3 ± 0,1	70	7;9,2	71,53	-	baja
Cloranfenicol	277	100	21,5 ± 0,8	90	7,83	27,09	-	alta
Alopurinol	251	100	0,64 ± 0,05	90	7,49	44,84	0	alta
Teofilina	272	100	1,9 ± 0,5	97	3,5;8,6	5,94	-	alta
Naproxeno	291	500	23,7 ± 0,3	98	4,6	99,84	-	alta
Verapamilo	230	480	0,9 ± 0,2	98	8,9	96,93	+	alta
Carbamazepina	276	4000	33 ± 3	100	1,5	0,00	0	alta
Propranolol	291	100	4,2 ± 0,4	100	0,6;14	0,00	+	alta
Caféina	272	200	1,8 ± 0,2	100	1,5	0,00	0	alta
Ketoprofeno	262	75	1,1 ± 0,2	100	4,45	99,89	-	alta
Antipirina	244	400	1,6 ± 0,3	100	9,67	99,47	0	Alta

^a Referencia bibliográfica de mayores dosis orales:³²

^b Referencias bibliográficas de datos de Fracción de dosis absorbida:^{8,12,23,32,33}

^c Referencias bibliográficas de datos de pKa:³⁴⁻³⁷

^d Los % de Ionización fueron calculados utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

^e Carga: de la molécula a pH 7,4 de acuerdo al % de ionización y al pKa.

6.2.2.1.1. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN DE LA MEMBRANA

Con el objetivo de demostrar la aplicabilidad y eficacia de la membrana, para predecir la permeabilidad de fármacos que son absorbidos por un mecanismo de difusión pasiva, fueron evaluados 14 compuestos activos (Figura 6.4) de fracción de dosis absorbida en humanos (Fa%) conocida.^{8,12,23,32,33} Los fármacos fueron elegidos de acuerdo con la recomendación de la FDA³⁷ de representar un rango amplio de características de absorción, que sean absorbidos por difusión pasiva y que presenten estructuras, comportamiento ácido base y solubilidades diversas para evaluar la capacidad predictiva del modelo.^{8,12,24,32-38} La correlación de %Fa y los valores de P_{app} , obtenidos con el método desarrollado, fue realizada utilizando el modelo propuesto por Amidon et. al. 1988, en base a la siguiente ecuación:³¹

$$\%Fa = (1 - e^{-A \cdot P_{app}}) \times 100 \quad (2)$$

donde A es el coeficiente de correlación entre los datos de %Fa y los P_{app} obtenidos mediante el ensayo de permeabilidad.

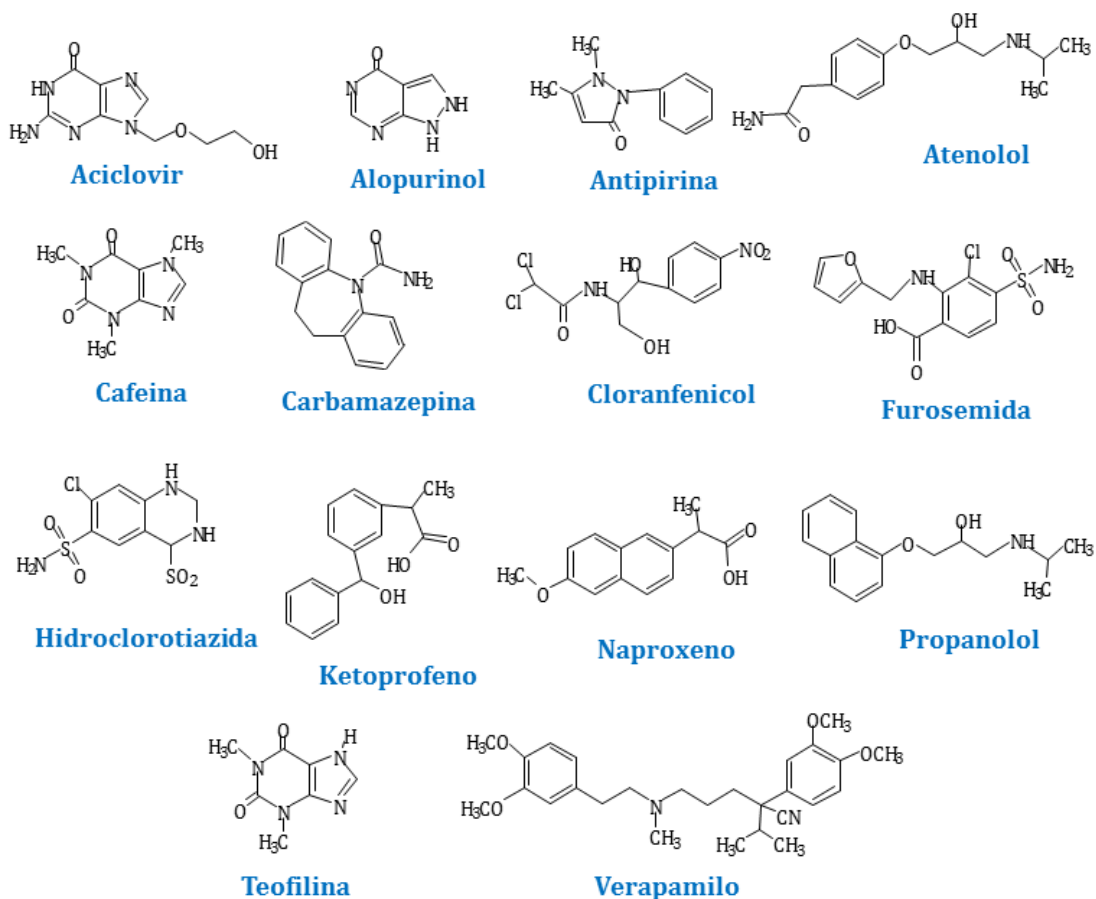


Figura 6.4. Estructuras químicas de los fármacos estándares utilizados para los estudios de validación de la membrana.

6.2.2.1.2. CLASIFICACIÓN DE SMR E INM DE ACUERDO AL SCB

Con el propósito de clasificar a SMR e INM de acuerdo al SCB, los coeficientes de permeabilidad de los fármacos puros fueron determinados mediante la incorporación de concentraciones equivalentes a las dosis orales ^{39,40} (Tabla 6.3.) en 250 mL, suspendidas en SRF de pH 7,4 dentro del compartimento donador. Las concentraciones iniciales de SMR e INM, fueron de 0,22 y 0,11 mg/mL, respectivamente. Las concentraciones de los fármacos fueron determinadas, por espectrofotometría UV, a 240 y 267 nm, respectivamente. Los P_{app} de SMR e INM fueron obtenidos a partir de la pendiente de la porción lineal inicial de la gráfica de dQ vs. t , utilizando la ecuación 1, para evaluar el comportamiento de permeabilidad de los IFA. Considerando que el SCB establece que un fármaco es considerado de alta solubilidad cuando la mayor dosis del mismo es soluble en

un volumen de 250 mL o menor de medio acuoso en el rango de pH entre 1 y 7,5,⁴⁰ los volúmenes necesarios para solubilizar la dosis de cada IFA modelo fueron calculados a partir de la solubilidad de los fármacos en agua, en SRF de pH 2 y de pH 8, con el fin de clasificarlos en términos de solubilidad.

6.2.2.1.3. EFECTO DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES SOBRE LA PERMEABILIDAD APARENTE DE LOS FÁRMACOS

Con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes formulaciones sobre la permeabilidad de los IFA, los coeficientes de permeabilidad de SMR e INM, contenidos en complejos binarios y ternarios con CD y/o MEG y en microemulsiones o liposomas, en ausencia o en presencia de ligandos (1,8% β -CD; 12% M- β -CD; 2,5% HP- β -CD; 5% MEG), fueron determinados tras la incorporación de 0,22 y 0,11 mg/mL de SMR e INM, respectivamente, en los sistemas mencionados, los cuales fueron preparados de acuerdo a los procedimientos descritos previamente. Los P_{app} de las formulaciones farmacéuticas fueron determinados a partir de la pendiente de las porciones iniciales de los gráficos de dQ vs t , mediante la utilización de la ecuación 1, a la vez que se efectuó el mismo procedimiento, utilizado para clasificar a los fármacos puros en términos de permeabilidad y solubilidad, descrito en la Sección 6.2.2.1.2.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD A TRAVÉS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES

6.3.1.1. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DEL PODER PREDICTIVO DEL MODELO DE PERMEABILIDAD

El propósito del presente estudio fue desarrollar un método rápido, eficaz, reproducible y de bajo costo capaz de predecir apropiadamente la permeabilidad de fármacos estructuralmente diversos y que son absorbidos por un mecanismo de difusión pasiva. Los experimentos de permeación fueron realizados usando celdas de difusión de Franz bicompartimentales, con una membrana artificial bio-mimética a $37,0 \pm 0,5$ °C y con agitación continua de 14000 rpm. Con el fin de demostrar la aplicabilidad y la eficacia predictiva del modelo, fueron obtenidos los valores P_{app} de 14 compuestos a partir de la ecuación 1, utilizando los porcentajes de fracción absorbida en humanos (%Fa) tomados de la literatura, los que son presentados en la Tabla 6.2. Estas sustancias resultan adecuadas para evaluar el poder predictivo del modelo ya que las mismas son absorbidas por un mecanismo de difusión pasiva, representan un amplio rango de características de absorción y presentan diversidad de estructuras, comportamiento ácido-base y solubilidades. En todos los experimentos, los cocientes entre las concentraciones del fármaco en el compartimento receptor y donador, a todos los tiempos, fueron iguales o menores a 0,1, indicando que se mantuvieron las condiciones de sumidero durante todo el procedimiento, así como los valores bajos de desviación estándar demostraron la buena reproducibilidad del método propuesto para una diversidad de compuestos. La correlación entre los %Fa y los valores de P_{app} obtenidos con el método desarrollado fue realizada mediante el ajuste exponencial de la curva expuesta en la Figura 6.5 utilizando la ecuación 2, propuesta por Amidon et. al. en 1988.³¹ Se observó una buena correlación para los 14 compuestos, evidenciada por un valor r^2 de 0,8517 con un coeficiente de correlación (A) de $-2,3 \pm 0,4$.

Considerando que el P_{app} de alopurinol, que presenta un %Fa de 90% fue de $0,64 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹, este valor fue establecido como el límite de alta permeabilidad para este método y fue utilizado para clasificar a los fármacos modelos, SMR e INM, de acuerdo al SCB. En el rango de baja permeabilidad ($P_{app} < 0,64 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹) el factor limitante de la velocidad de permeación es la difusión a través de la membrana, como fue previamente reportado por Sugano et. al.³⁰ Por otro lado, en el rango de alta permeabilidad ($P_{app} > 0,64 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹) el límite superior fue demarcado por la línea correspondiente a Fa = 100% y se registró para un amplio rango de valores de P_{app} de $(1,1 \text{ a } 33) \times 10^{-6}$ cm s⁻¹, indicando que la limitante de la permeabilidad acuosa, en esta región, es la difusión a través de la capa estática de agua alrededor de las partículas es la etapa limitante de la velocidad.³¹

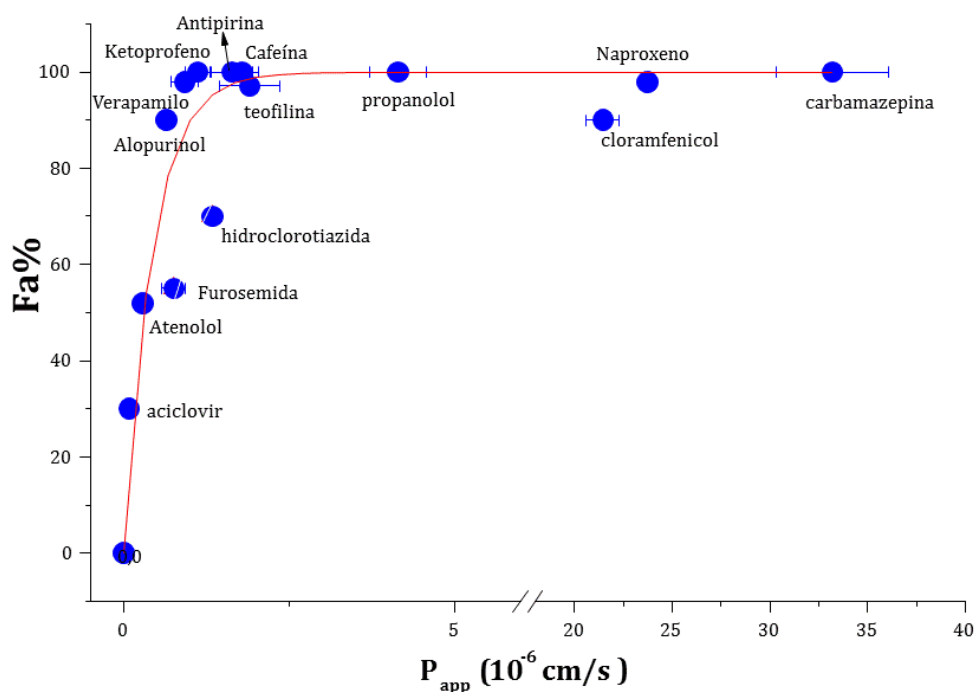


Figura 6.5. Correlación entre la fracción absorbida en humanos (Fa%) y los coeficientes de permeabilidad aparentes (P_{app}) obtenidos para 14 compuestos

6.3.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS MODELO DE ACUERDO AL SCB

Con el objetivo de clasificar a los fármacos modelos de acuerdo al SCB, los P_{app} de SMR e INM suspendidas en SRF, fueron determinados a partir de las pendientes de las porciones lineales iniciales de los gráficos de dQ vs t y utilizando la ecuación 1. Los valores de P_{app} fueron de $(5,9 \pm 0,7)$ y $(16,7 \pm 0,7) \times 10^{-6}$ cm s⁻¹ para SMR e INM, respectivamente, así como los valores predichos de %Fa a partir de la Ecuación 2, fueron del 100% en ambos casos (Tabla 6.3). De acuerdo al límite de permeabilidad para este método, establecido en la Sección 6.3.1.1 ($P_{app} > 0,64 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹), ambos fármacos fueron clasificados como compuestos altamente permeables. Por otro lado, considerando que el SCB establece que un compuesto es considerado de alta solubilidad cuando la mayor dosis es soluble en un volumen de medio acuoso de 250 mL o menor, en el rango de valores de pH comprendido entre 1 y 7,5;³⁷ los volúmenes necesarios para solubilizar la dosis de cada fármaco modelo fueron calculados a partir de los valores de solubilidad en agua, en SRF de pH 2 y de pH 8 y son presentados en la Tabla 6.3. Las SRF de pH 2 y pH 8 fueron elegidas debido a que ambos fármacos son ácidos débiles que se encontrarán totalmente neutros o ionizados a estos valores de pH ($pK_{a(SMR)} = 2,06; 6,9$;⁴¹ $pK_{a(INM)} = 4,5$;³⁶) y por lo tanto, presentarán mínima o máxima solubilidad, respectivamente. Como pudo observarse en la tabla 6.3, los volúmenes necesarios para solubilizar las mayores dosis terapéuticas de SMR e INM a pH 2 (759,09 y 5000,00 mL) y en agua (521,88 y 625000,0 mL) fueron mayores a 250 mL. Estos resultados permiten clasificar a ambos fármacos como escasamente solubles, por lo tanto, debido a que presentaron alta permeabilidad, pueden ser clasificados como de CLASE II de acuerdo al SCB.

Tabla 6.3. Mayores dosis orales, coeficientes de permeabilidad aparentes (P_{app}), fracción de dosis absorbida (Fa%), solubilidades intrínsecas (S_0) y volúmenes necesarios para solubilizar la mayor dosis en agua, pH 2 y pH 8 para SMR e INM.

	Mayor dosis oral (mg) ^a	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Fa (%)	S_0 (mg/mL)			Volumen necesario (mL)		
				en agua	a pH 2	a pH 8	en agua	a pH 2	a pH 8
SMR	167	5,9 ± 0,7	100,00	0,22 ± 0,04	0,32 ± 0,06	1,6 ± 0,2	759,09	521,88	104,38
INM	50	16,7 ± 0,7	100,00	0,010 ± 0,003	(8 ± 1) $\times 10^{-5}$	3,9 ± 0,2	5000,00	625000,0	12,82

^a Referencias bibliográficas de datos de mayores dosis orales: SMR,⁴¹ INM.⁴²

6.3.1.3. EFECTO DE DIFERENTES FORMULACIONES SOBRE LA PERMEABILIDAD APARENTE DE LOS FÁRMACOS

Con el propósito de evaluar el efecto de diferentes formulaciones sobre la permeabilidad de los fármacos vehiculizados, se realizaron experimentos de permeación para SMR e INM incorporadas en los complejos binarios y ternarios con MEG y/o β -CD, M- β -CD, HP- β -CD, en las microemulsiones y en los liposomas descritos previamente. Los P_{app} de cada producto farmacéutico fueron determinados a partir de las pendientes de las porciones lineales iniciales de los gráficos de dQ vs t (Figuras 6.6, 6.7 y 6.8) utilizando la ecuación 1 y los datos se muestran en las Tablas 6.4, 6.5 y 6.6, respectivamente.

SMR e INM contenidas en los complejos binarios y SMR incluida en los complejos ternarios presentaron valores de %Fa mayores a 99%, sugiriendo que la permeabilidad de los fármacos no se encuentra afectada por la complejación, tras el beneficio de la aplicación de esta estrategia de solubilización. La permeación de los complejos ternarios de SMR fue más sostenida que la de los complejos binarios, y ambos presentaron permeación más sostenida que la de SMR pura, con perfiles similares entre ellos. Los complejos binarios de INM presentaron perfiles similares a los del fármaco puro. Este comportamiento es probablemente debido a que los complejos de SMR presentan una hidrofiliidad notablemente mayor que la del fármaco puro, encontrando así mayor limitación de la velocidad de permeación en la etapa de difusión por la membrana.

Por otro lado, todas las ME presentaron valores de %Fa superiores al 90% observándose perfiles de permeación más sostenida que la de los fármacos, con perfiles similares entre ellos, con excepción de las ME con β -CD e HP- β -CD conteniendo INM que presentaron perfiles similares a los del fármaco puro, como se observó para los complejos binarios de INM con CD. La razón de la permeación más sostenida probablemente sea debida a una reducción en el tamaño de los canales de agua y a un incremento en la micro-viscosidad de la formulación que produce un efecto de retención de los fármacos.

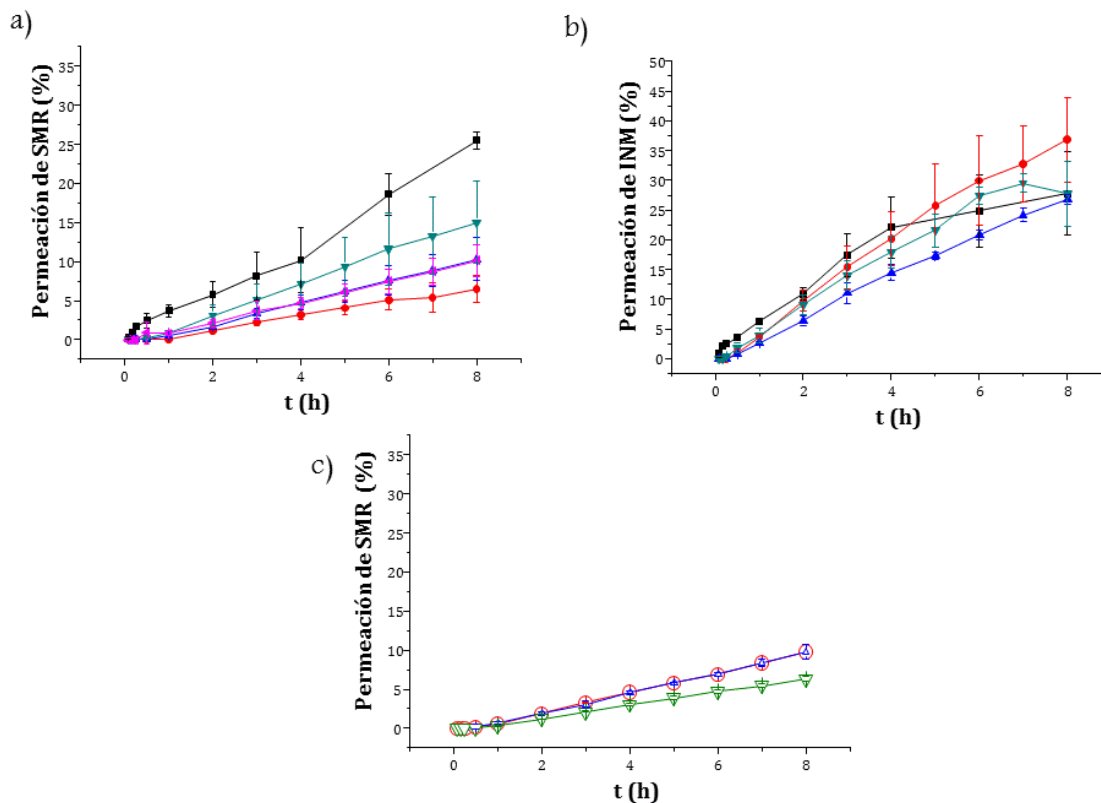


Figura 6.6. Perfiles de permeabilidad de los complejos binarios de a) SMR y b) INM y de: c) complejos ternarios de SMR: fármacos en SRF (■); complejos con β -CD (●); M- β -CD (▲); HP- β -CD (▼); o MEG (◄).

Por otra parte, fue evaluada la permeación de los fármacos a partir de los liposomas, en ausencia y en presencia de β -CD, M- β -CD, HP- β -CD o MEG (Figura 6.9 y 6.10), observándose que los fármacos presentaron valores de %Fa superiores al 99%. La permeación fue más sostenida que la de los fármacos puros y con perfiles similares entre ellos, excepto para el sistema con M- β -CD conteniendo INM que presentó un perfil muy similar al del fármaco puro.

Tabla 6.4. Coeficientes de permeabilidad aparentes (P_{app}), fracción absorbida ($Fa\%$), solubilidades (S) y volúmenes necesarios para solubilizar la mayor dosis en agua, y en soluciones de pH 2 y pH 8 para SMR e INM contenidas en complejos binarios y ternarios con ciclodextrinas y/o meglumina.

	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm s $^{-1}$)	Fa (%)	S (mg/mL)			Volumen necesario (mL)		
			agua	pH 2	pH 8	Agua	pH 2	pH 8
SMR	5,9 ± 0,7	100,00	0,22	0,32	1,6	759,09	521,88	98,24
SMR:β-CD	4 ± 1	100,00	0,83	1,15	3,768	201,20	145,22	44,32
SMR:M-β-CD	3,9 ± 0,9	100,00	2,2	3,5	8,1	75,91	47,71	20,62
SMR:HP-β-CD	6,7 ± 0,9	100,00	0,69	0,99	1,9	242,03	168,69	87,89
SMR:MEG	3,7 ± 0,6	100,00	46,8	0,35	54,8	3,57	477,14	3,05
SMR:β-CD:MEG	3,1 ± 0,9	99,99	0,97	1,3	2,36	172,16	128,46	70,76
SMR:M-β-CD:MEG	3,1 ± 0,9	99,99	6,28	2,8	11	26,59	59,64	15,18
SMR:HP-β-CD:MEG	3 ± 1	99,99	4,4	1,23	2,5	37,95	135,77	66,80
INM	16,7 ± 0,7	100,00	0,010	8,00.10 $^{-5}$	0,070	5000	625000	714,29
INM:β-CD	18 ± 5	100,00	0,039	0,0145	5,861	1269	3445	8,53
INM:M-β-CD	9,7 ± 0,3	100,00	1,006	0,026	15,801	49,70	1947	3,16
INM:HP-β-CD	12,0 ± 0,8	100,00	0,028	0,0034	0,796	1799	14902	62,85

Del mismo modo que con los fármacos puros, los volúmenes necesarios para solubilizar la dosis de los fármacos contenidos en las formulaciones estudiadas fueron calculadas a partir de las solubilidades en agua, y en SRF de pH 2 y pH 8 y son presentadas en las Tablas 6.4, 6.5 y 6.6. A modo ilustrativo, en la Figura 6.9. se presentan las solubilidades en agua de los fármacos contenidos en todas las formulaciones.

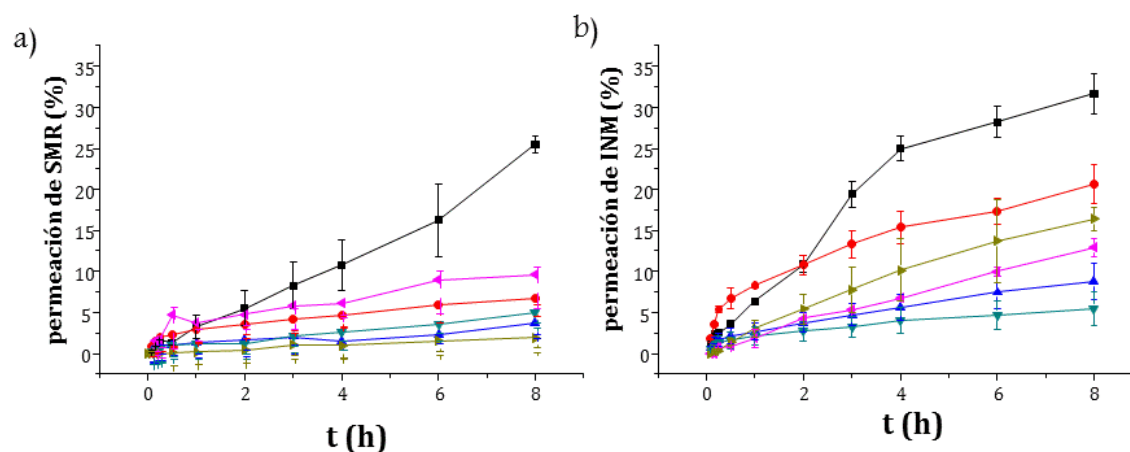


Figura 6.7. Perfiles de permeabilidad de SMR e INM: en SRF (■) en ME $_1$ (●); en ME $_2$ (▲); en ME $_3$ (▼); en ME $_4$ (◀) y en ME $_5$ (▶);

Tabla 6.5. Coeficientes de permeabilidad aparentes (P_{app}), fracción absorbida (Fa%), solubilidades y volúmenes necesarios para solubilizar la mayor dosis en agua, y en soluciones de pH 2 y pH 8 para SMR e INM contenidas en diferentes ME.

Muestra	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Fa (%)	S (mg/mL)		Volumen necesario (mL)	
			agua	pH 8	agua	pH 8
SMR	7 ± 1	100,00	0,22	1,66	759,09	100,75
SMR en ME₁	2,0 ± 0,1	99,85	6,02203	2,7548	27,73	60,62
SMR en ME₂	1,0 ± 0,1	95,24	7,47216	5,0152	22,35	33,30
SMR en ME₃	1,5 ± 0,2	99,27	5,61844	9,7007	29,72	17,22
SMR en ME₄	4,7 ± 0,5	100,00	13,346	13,00381	12,51	12,84
SMR en ME₅	0,8 ± 0,2	92,73	21,05	16,63	7,93	10,04
SMR en ME₅ + β-CD	2,6 ± 0,6	99,97	17,30	20,18	9,65	8,28
SMR en ME₅ + M-β-CD	5,2 ± 0,7	100,00	9,62	12,24	17,36	13,64
SMR en ME₅ + HP-β-CD	2,3 ± 0,9	99,94	22,53	26,39	7,41	6,33
SMR en ME₅ + MEG	2,2 ± 0,4	99,91	32,36	35,96	5,16	4,64
INM	15 ± 3	100,00	0,01	8,00E-05	5000,00	625000,00
INM en ME₁	5,3 ± 0,3	100,00	18,48	16,17	2,70	3,09
INM en ME₂	2,6 ± 0,7	99,98	26,82	30,41	1,86	1,64
INM en ME₃	2,2 ± 0,6	99,90	38,62	41,49	1,29	1,21
INM en ME₄	4,7 ± 0,3	100,00	48,33	52,12	1,03	0,96
INM en ME₅	10 ± 2	100,00	67,014	59,91	0,75	0,83
INM en ME₅ + β-CD	12 ± 3	100,00	65,26	73,11	0,77	0,68
INM en ME₅ + M-β-CD	7 ± 1	100,00	25,77	36,77	1,94	1,36
INM en ME₅ + HP-β-CD	12 ± 2	100,00	64,99	62,06	0,77	0,81

Para las ME, la solubilidad en SRF de pH 2 no fue tomada en consideración debido a que no fue posible preparar las formulaciones a este valor de pH debido a la presencia de OS en su forma neutra (ver Capítulo III). Se observó que los volúmenes necesarios para solubilizar a la SMR contenida en los complejos fueron menores a 250 mL para la mayoría de los sistemas en todos los medios acuosos evaluados, con excepción del sistema SMR:MEG a pH 2, para el cual se había observado una disminución en la concentración de SMR en función de la de MEG, probablemente debido a que los grupos amino de ambos se encuentran protonados en este medio [$pK_{a(SMR\ amino)} = 2,6$;⁴¹ $pK_{a(MEG)} = 9,5$]⁴² provocando repulsión electrostática y desfavoreciendo así la formación de un sistema binario (Sección 2.3.1.1.1.). Ninguno de los complejos de INM con las CD presentó volúmenes de solubilización menores a 250 mL en los tres medios, no alcanzando así el objetivo deseado al aplicar esta estrategia de solubilización.

Tabla 6.6. Coeficientes de permeabilidad aparentes (P_{app}), fracción absorbida ($Fa\%$), solubilidades en agua (S_{agua}) y volúmenes necesarios para solubilizar la mayor dosis en agua para SMR e INM contenidas en diferentes liposomas.

Muestra	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Fa%	S_{agua} (mg/mL)	Volumen necesario (mL)
SMR	7 ± 1	100,00	0,22	759,09
SMR FC:COL 1:1	3 ± 1	100,00	1,76	94,89
SMR FC:COL 2:1	1,7 ± 0,5	99,59	2,05	81,46
SMR FC:COL 3:1	1,9 ± 0,5	99,80	2,12	78,77
SMR FC	2,4 ± 0,2	99,95	1,48	112,84
SMR DRV 3:1 β -CD	3,3 ± 1,1	100,00	0,6	278,33
SMR DRV 3:1 M- β -CD	4,8 ± 0,7	100,00	1,86	89,78
SMR DRV 3:1 HP- β -CD	5 ± 0,4	100,00	1,34	124,63
SMR DRV 3:1 MEG	3 ± 0,3	99,99	28,37	5,89
INM	14 ± 3	100,00	0,02	625000,00
INM FC:COL 1:1	4,6 ± 0,4	100,00	0,1	300,000
INM FC:COL 2:1	3,7 ± 1,0	100,00	0,11	272,727
INM FC:COL 3:1	2,0 ± 0,9	99,82	0,1	300,000
INM FC	2,0 ± 0,8	99,85	0,11	272,727
INM DRV3:1 β CD	10,1 ± 0,9	100,00	0,83	36,145
INM DRV3:1 M β CD	15,0 ± 0,9	100,00	1,31	22,901
INM DRV3:1 HP β CD	12,2 ± 2,5	100,00	1,08	27,778

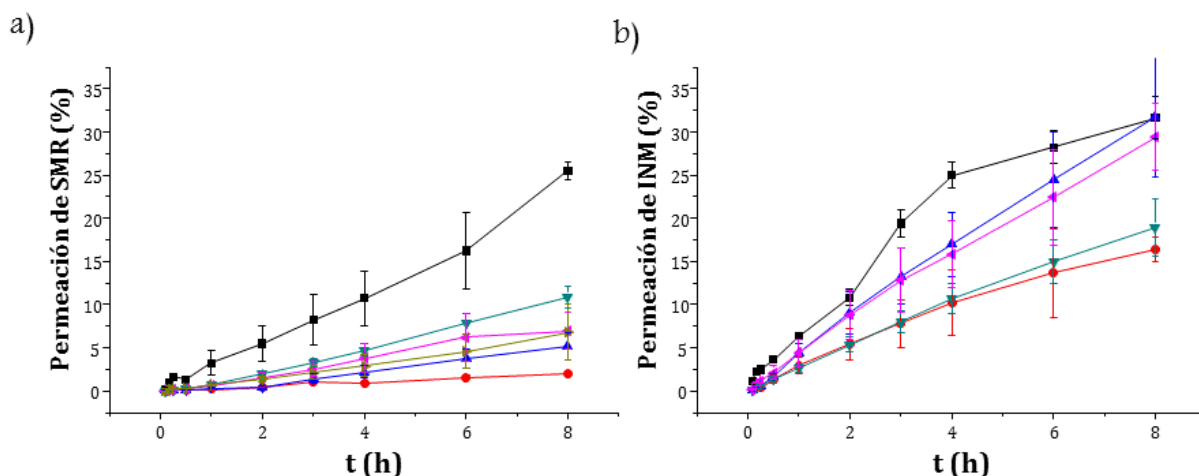


Figura 6.8. Perfiles de permeabilidad de SMR e INM: en SRF (■); en ME5 en ausencia de ligando (●); conteniendo 1,8% β -CD (▲); 12% M- β -CD (▼); 2,5% HP- β -CD (◀); o 5% MEG (▶) como fase acuosa.

Por otro lado, los volúmenes necesarios para solubilizar a SMR e INM fueron menores a 60,6 y 3,1 mL cuando ambos IFA fueron incorporados en las formulaciones de ME nativas y menores a 17,4 y 2,0 mL cuando fueron introducidos en ME conteniendo ligandos, respectivamente. Los volúmenes necesarios para solubilizar la dosis de SMR incorporada en la mayoría de los liposomas, excepto SMR DRV 3:1 β -CD, y de INM incorporada en los liposomas DRV conteniendo ligandos, fueron menores a 250 mL. A partir de estos resultados, puede concluirse que la mayoría de los complejos y todas las ME conteniendo ambos fármacos, así como INM incorporada en los liposomas DRV conteniendo ligandos, fueron clasificados como productos farmacéuticos altamente solubles. Por ello, como estos sistemas presentaron tanto alta permeabilidad como alta solubilidad, pueden ser clasificados como de CLASE I de acuerdo al SBC.

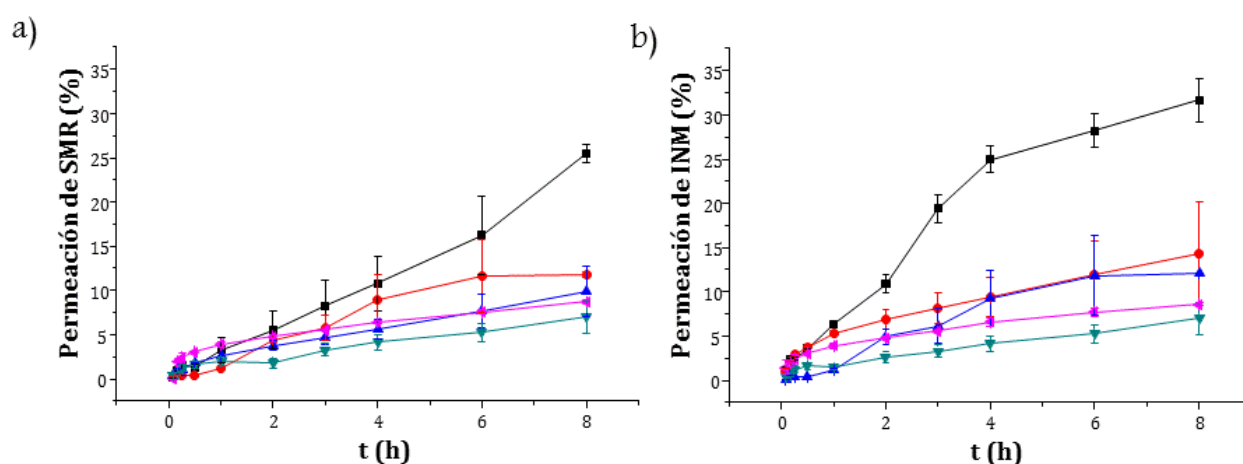


Figura 6.9. Perfiles de permeabilidad de a) SMR y b) INM: puras (■); o en liposomas FC:COL 1:1 (●); FC:COL 2:1 (▲); FC:COL 3:1 (▼); FC (◄).

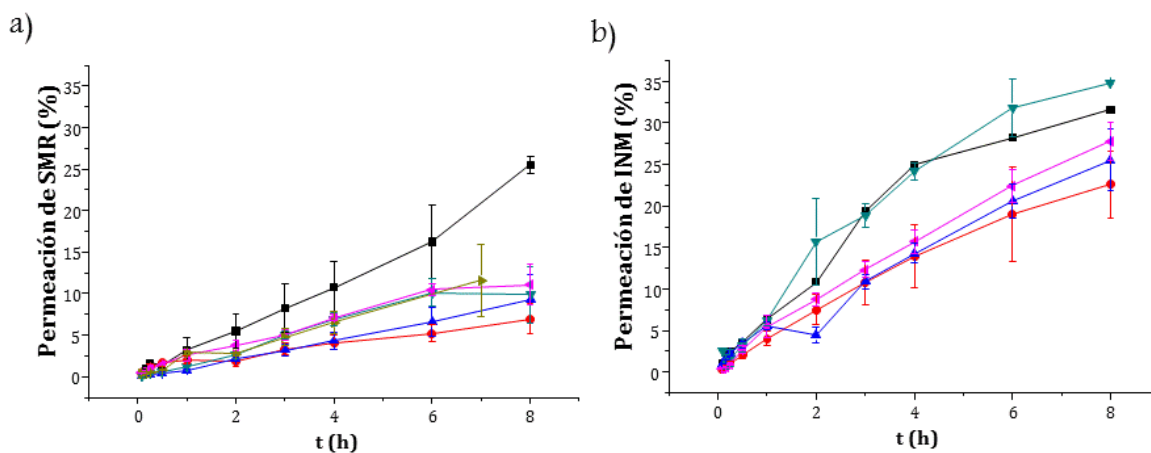


Figura 6.10. Perfiles de permeabilidad de: a) SMR y b) INM: puras (■); en liposomas FC:COL 3:1 en ausencia de ligando (●) o conteniendo: β -CD (▲); M- β -CD (▼); HP- β -CD (◄) o MEG (►).

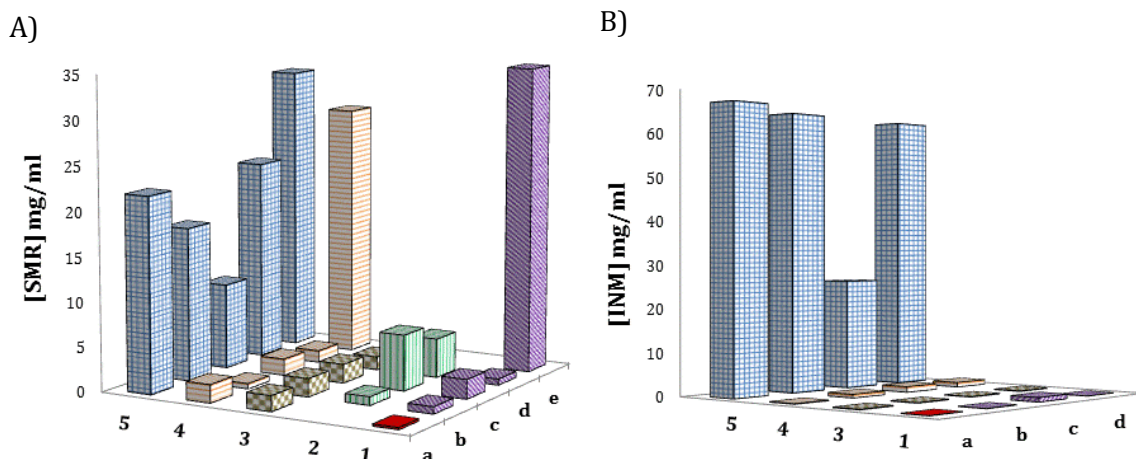


Figura 6.10. Solubilidades en agua de A) SMR y B) INM: **1a)** puras; **1)** en complejos binarios; **2)** en complejos ternarios (sólo SMR); **3)** en liposomas a) FC:COL 1:1, b) 2:1, c) 3:1 o d) FC; **4)** en liposomas DRV FC:COL 3:1 a) en ausencia de ligando, b) conteniendo 1,8% β -CD, c) 12% M- β -CD, d) 2,5% HP- β -CD o e) 5% MEG (sólo SMR); o **5)** en microemulsiones conteniendo a) agua, b) 1,8% β -CD, c) 12% M- β -CD, d) 2,5% HP- β -CD o e) 5% MEG (sólo SMR).

6.4. CONCLUSIONES PARCIALES

Se observó una buena correlación entre los %Fa y los valores de P_{app} obtenidos mediante el método desarrollado a través de la evaluación de 14 compuestos, los cuales son absorbidos por un mecanismo de difusión pasiva y representan un amplio rango de características de absorción, diversidad estructural, de comportamiento ácido-base y solubilidades. Se mantuvo la condición de sumidero durante todo el procedimiento y los valores de desviación estándar bajos demostraron la buena reproducibilidad del método propuesto para una diversidad de compuestos. El P_{app} de Alopurinol, que presenta un %Fa de 90%, fue establecido como límite de alta permeabilidad para el corriente método y el mismo fue utilizado para clasificar a los fármacos modelos de acuerdo al SCB. De este modo, pudo desarrollarse y validarse exitosamente un método rápido, eficaz, reproducible y de bajo costo para la predicción apropiada de la permeabilidad de fármacos de estructuras diversas que son absorbidos por un mecanismo de difusión pasiva. SMR e INM fueron clasificados como CLASE II de acuerdo al SCB. Los valores de %Fa determinados para todos los productos farmacéuticos se mantuvieron por encima del 90%, demostrando así que la permeabilidad de los IFA no fue afectada por la incorporación de los mismos en los complejos, en las MEs o en los liposomas, sistemas que permitieron aumentar la solubilidad.

La mayoría de los complejos y de los liposomas conteniendo SMR, todas las ME conteniendo ambos fármacos, e INM incorporada en los liposomas DRV conteniendo ligandos, fueron clasificados como productos farmacéuticos altamente solubles. Como los mismos presentaron alta permeabilidad y alta solubilidad, pueden ser clasificados como de CLASE I, de acuerdo al SCB, otorgando una gama de posibilidades para incrementar la biodisponibilidad de estos fármacos y, por lo tanto, con ello mejorar el desempeño terapéutico de los mismos.

6.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lipka E, Amidon GL. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J Control Release* 1999;62:41–9.
2. Giorno L, Mazzei R, Drioli E. Biological Membranes and Biomimetic Artificial Membranes. In: Drioli E, Giorno LBT-CMS and E, editors. *Role and Function of Biological and Artificial Membranes*. Oxford: Elsevier; 2010. page 1–12.
3. Måsson M, Loftsson T, Måsson G, Stefánsson E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and *in vitro* testing. *J Control Release* 1999;59:107–18.
4. Li H, Dong L, Liu Y, Wang G, Zhang L, Qiao Y. Comparison of two approaches of intestinal absorption by puerarin. *J Pharmacol Toxicol* 2014;70:6–11.
5. Silva AE, Barratt G, Chéron M, Egitto EST. Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. *Int J Pharm* 2013;454:641–8.
6. Gantzsch SP, Kann B, Ofer-Glaessgen M, Loos P, Berchtold H, Balbach S, et al. Characterization and evaluation of a modified PVPA barrier in comparison to Caco-2 cell monolayers for combined dissolution and permeation testing. *J Control Release* 2014;175:79–86.
7. Li G, Fan Y, Li X, Wang X, Li Y, Liu Y, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. *Int J Pharm* 2012;425:53–61.
8. Velický M, Tam KY, Dryfe RAW. *In situ* artificial membrane permeation assay under hydrodynamic control: Correlation between drug *in vitro* permeability and fraction absorbed in humans. *Eur J Pharm Sci* 2011;44:299–309.
9. Mou D, Chen H, Wan J, Xu H, Yang X. Potent dried drug nanosuspensions for oral bioavailability enhancement of poorly soluble drugs with pH-dependent solubility. *Int J Pharm* 2011;413:237–44.
10. Dahan A, Lennernäs H, Amidon GL. The fraction dose absorbed, in humans, and high jejunal human permeability relationship. *Mol Pharm* 2012;9:1847–51.
11. Klose D, Delplace C, Siepman J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. *Int J Pharm* 2011;404:75–82.
12. Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Furlanetto S, Mura P. Development and evaluation of an *in vitro* method for prediction of human drug absorption I. Assessment of artificial membrane composition. *Eur J Pharm Sci* 2006;27:346–53.
13. Li H, Dong L, Liu Y, Wang G, Wang G, Qiao Y. Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats. *Int J Pharm* 2014;466:133–8.
14. Samiei N, Mangas-Sanjuan V, González-Álvarez I, Foroutan M, Shafaati A, Zarghi A, et al. Ion-pair strategy for enabling amifostine oral absorption: Rat *in situ* and *in vivo* experiments. *Eur J Pharm Sci* 2013;49:499–504.
15. Fang JY, Sung KC, Lin HH, Fang CL. Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Pharm* 1999;178:83–92.

16. Langguth P, Kubis A, Krumbiegel G, Lang W, Merkle HP, Wächter W, et al. Intestinal absorption of the quaternary trospium chloride: permeability-lowering factors and bioavailabilities for oral dosage forms. *Eur J Pharm Biopharm* 1997;43:265–72.
17. Fei Y, Kostewicz ES, Sheu M-T, Dressman JB. Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted humans using an *in vitro*–*in silico*–*in vivo* approach. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;85:1274–84.
18. Yang C, Zhang T, Li Z, Xu L, Liu F, Ruan J, et al. P-glycoprotein is responsible for the poor intestinal absorption and low toxicity of oral aconitine: *In vitro*, *in situ*, *in vivo* and *in silico* studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;273:561–8.
19. Sjögren E, Westergren J, Grant I, Hanisch G, Lindfors L, Lennernäs H, et al. *In silico* predictions of gastrointestinal drug absorption in pharmaceutical product development: Application of the mechanistic absorption model GI-Sim. *Eur J Pharm Sci* 2013;49:679–98.
20. Jarho P, Urtti A, Pate DW, Pekka S, Tomi J. Increase in aqueous solubility, stability and *in vitro* corneal permeability of anandamide by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm* 1996;137:209–16.
21. Sajeesh S, Bouchemal K, Marsaud V, Vauthier C, Sharma CP. Cyclodextrin complexed insulin encapsulated hydrogel microparticles: An oral delivery system for insulin. *J Control Release* 2010;147:377–84.
22. Klimundová J, Šatinský D, Sklenářová H, Solich P, Satinský D, Sklenářová H. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. *Talanta* 2006;69:730–5.
23. Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H, Saitoh K, Terada K. Optimized conditions of biomimetic artificial membrane permeation assay. *Int J Pharm* 2001;228:181–8.
24. Peng Y, Yadava P, Heikkinen AT, Parrott N, Railkar A. Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development. *Eur J Pharm Sci* 2014;56:120–30.
25. Sevin E, Dehouck L, Fabulas-da Costa A, Cecchelli R, Dehouck MP, Lundquist S, et al. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol* 2013;68:334–9.
26. Yang Y, Bai L, Li X, Xiong J, Xu P, Guo C, et al. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood–brain barrier cell and Caco-2 cell models. *Toxicol Vitro* 2014;28:388–96.
27. Zhu M-L, Liang X-L, Zhao L-J, Liao Z-G, Zhao G-W, Cao Y-C, et al. Elucidation of the transport mechanism of baicalin and the influence of a *Radix Angelicae Dahuricae* extract on the absorption of baicalin in a Caco-2 cell monolayer model. *J Ethnopharmacol* 2013;150:553–9.
28. Fujikawa M, Ano R, Nakao K, Akamatsu M. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: Application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorg Med Chem* 2005;13:4721–32.
29. Sugano K, Nabuchi Y, Machida M, Aso Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int J Pharm* 2003;257:245–51.
30. Sinkó B, Garrigues TM, Balogh GT, Nagy ZK, Tsinman O, Avdeef A, et al. Skin–PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *Eur J Pharm Sci* 2012;45:698–707.

31. Amidon GL, Sinko PJ, Fleisher D. Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm Res* 1988;5:651–4.
32. Masaoka Y, Tanaka Y, Kataoka M, Sakuma S, Yamashita S. Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Eur J Pharm Sci* 2006;29:240–50.
33. Paixão P, Gouveia LF, Morais JAG. Prediction of the human oral bioavailability by using *in vitro* and *in silico* drug related parameters in a physiologically based absorption model. *Int J Pharm* 2012;429:84–98.
34. Bhosale U V, Kusum Devi V, Jain N. Formulation and optimization of mucoadhesive nanodrug delivery system of acyclovir. *J Young Pharm* 2011;3:275–83.
35. Drug Bank. Open data & Target database [Internet]. 2014; Available from: www.drugbank.ca
36. Thompson JE. A practical guide to contemporary pharmacy. Baltimore, Philadelphia: 2009.
37. (CDER/FDA). Guidance for Industry Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and and bioequivalence studies for immediate release dosage forms based on a biopharmaceutical classification system. Center for Drug Evaluation and Research. 2000;
38. Gennaro AR. Volume 2 of Remington Farmacia/ Remington The Science and Practice of Pharmacy Remington farmacia, Joseph Price Remington. Ed. Médica Panamericana; 2003.
39. MIMS Drug Information System. Indomethacin [Internet]. 2014 [Last access: 2014 Sep 2]; Available from: <http://www.mims.com/USA/drug/info/Indomethacin/Indomethacin Capsule?type=full#Dosage>
40. MIMS Drug Information System. Sulfamerazine [Internet]. 2014 [Last access: 2014 Sep 2]; Available from: <http://www.mims.com/USA/drug/info/sulfamerazine/?type=full&mtype=generic>
41. Qiang Z, Adams C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 2004;38:2874–90.

CAPÍTULO VII:

***CONCLUSIÓN Y
PROYECCIONES***

7.1. CONCLUSIÓN

Mediante el presente trabajo de Tesis fue posible demostrar la formación de los complejos binarios y ternarios de los IFA SMR e INM con CD y/o MEG, y se realizó la caracterización de los mismos, tanto en solución como en estado sólido por diferentes metodologías analíticas. Pudo determinarse el efecto de los sistemas sobre la solubilidad de los fármacos, observándose aumentos significativos en la solubilización en comparación con los IFA libres, a la vez que MEG demostró la mayor eficacia para aumentar la solubilidad de SMR respecto a las CD. El mayor incremento en solubilidad fue obtenido con la estrategia de combinar la formación de sistemas binarios con MEG y el ajuste del pH. Además, se observó un efecto de solubilización adicional de M- β -CD e HP- β -CD en presencia de MEG. Además, los complejos binarios con β -CD, M- β -CD, HP- β -CD y MEG permitieron la liberación sostenida de los fármacos, así como los sistemas ternarios con β -CD y M- β -CD produjeron un efecto de retención adicional, mientras que el complejo ternario con HP- β -CD incrementó significativamente el efecto de liberación de SMR.

Los sistemas ternarios mostraron una clara superioridad frente a los complejos binarios, en términos de solubilidad y de modulación de la liberación.

Por otro lado, fue posible obtener microemulsiones mediante un procedimiento simple y a partir de componentes altamente biocompatibles, capaces de incorporar cantidades apreciables de los IFA. Se observaron claramente las ventajas de la estrategia de combinar CD y MEG con ME, principalmente en cuanto a las cantidades incorporadas de SMR e INM, principalmente con MEG en agua para SMR y β -CD en SRF 8 para INM, así como la presencia de MEG y M- β -CD en las ME incrementó significativamente la cantidad liberada de los fármacos.

Además, mediante los estudios realizados fue posible desarrollar liposomas para la vehiculización de los IFA de escasa solubilidad acuosa. Se determinó que ambos los fármacos se encontraron principalmente localizados en la bicapa lipídica de los liposomas. La encapsulación de los fármacos fue alta, principalmente tras la incorporación de las CD y MEG, utilizando la metodología de deshidratación-rehidratación, resultando una metodología prometedora para mejorar la biodisponibilidad de fármacos hidrofóbicos.

Más aún, fue posible desarrollar y validar exitosamente un método rápido, eficaz, reproducible y de bajo costo para la predicción apropiada de la permeabilidad de fármacos de estructuras diversas y que son absorbidos por un mecanismo de difusión pasiva. SMR e INM presentaron alta permeabilidad y fueron clasificados como de CLASE II, de acuerdo al SCB. Los estudios de permeación, a través de membranas artificiales, demostraron que la permeabilidad de los IFA no fue afectada por la incorporación de los mismos en los complejos, las ME o liposomas, ante el empleo beneficioso de estas como estrategias de solubilización. Todos los complejos de SMR, todas las ME conteniendo ambos fármacos, SMR incorporada en todos los liposomas, así como INM incorporada en los liposomas DRV conteniendo ligandos, presentaron alta permeabilidad y alta solubilidad, por lo cual todos los sistemas pueden ser clasificados como CLASE I de acuerdo al SCB, presentando beneficios tanto terapéuticos como a nivel de producción industrial.

Consideramos que mediante los resultados obtenidos los objetivos propuestos, al inicio de este proyecto, fueron concretados, ya que se desarrolló una amplia gama de productos farmacéuticos de bajo costo y fácil preparación, capaces de incrementar la biodisponibilidad de los fármacos escasamente solubles en agua. Las formulaciones y metodologías desarrolladas resultan

promisorias, no sólo para mejorar el desempeño terapéutico de los IFA, sino que también podrían ser de interés desde el punto de vista industrial debido al impacto económico que puede generar sus bajos costos. Podemos afirmar que la combinación de las CD o MEG, con los sistemas nanoestructurados, presenta ventajas apreciables en su aplicación, principalmente en relación a la solubilización de los fármacos hidrofóbicos.

7.2. PROYECCIONES

Este trabajo de Tesis presenta proyecciones orientadas al estudio del efecto de sistemas sólidos auto microemulsionables [Self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS)] sobre la biodisponibilidad oral de fármacos hidrofóbicos, las cuáles serán realizadas en el marco de un proyecto posdoctoral. Los SMEDDS son mezclas isotrópicas de aceites, surfactantes y usualmente un cosurfactante (o co-solubilizante), en los cuales un fármaco se encuentra disperso. Estos sistemas una vez dispersos en un medio acuoso con agitación moderada forman microemulsiones (ME), por lo que tras su administración y dispersión en los fluidos gástricos la formación de ME se ve facilitada por los movimientos peristálticos del tracto gastrointestinal.

El objetivo general del proyecto contempla el desarrollo de estrategias, que permitan aumentar la solubilidad de fármacos, ya que esta propiedad se encuentra estrechamente asociada a la biodisponibilidad oral de fármacos que presentan escasa solubilidad acuosa.

ANEXOS

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PUBLICADOS DURANTES EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO DE TESIS

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES:

TRABAJOS PUBLICADOS:

C. Garnero, C. Aloisio and M. Longhi, "Study of the interaction of ibuprofen with maltodextrins: complex characterization and enantiomeric recognition". *Pharmacology and Pharmacy*, 2013; 4: 18-30.

C. Aloisio, A. Gomes de Oliveira, M. Longhi. "Characterization, inclusion mode, phase-solubility and *in vitro* release studies of inclusion binary complexes with cyclodextrins and binary system with meglumine using sulfamerazine as model drug". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2014; 40(7): 919-928.

C. Aloisio, A. Gomes de Oliveira, M. Longhi. "Solubility and release modulation effect of Sulfamerazine ternary complexes with cyclodextrins using meglumine". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014; 100:64-73.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS:

INTERNACIONALES:

XII Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana. Montevideo, Uruguay, noviembre de 2008. Comunicación libre: Poster. C. Garnero, C. Aloisio y M. Longhi. "Estudio de la Interacción entre Ibuprofeno y Maltodextrinas".

7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, CIFARP, Ribeirão Preto, San Pablo, Brasil, setiembre de 2009. Comunicación libre: Poster. C. Aloisio, A. Delrivo, A. Zoppi and M.R. Longhi. "Solubilization of sulfamerazine by complexation with cyclodextrin".

XX Congreso Panamericano de Farmacia y XIV Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana. Porto Alegre, Brasil, Mayo 2010. Comunicación libre: Poster. C. Aloisio y M. Longhi. "Estudios en solución y en estado sólido de complejos de furoato de diloxanida con ciclodextrinas".

1º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina. Junio 2010. Comunicación libre: Poster. C. Aloisio y M. Longhi. "Enhancement of sulphamerazine solubility by its interaction with meglumine".

VIII Congreso Brasileño y III Congreso Pan Americano de Análisis Térmico y Calorimetría (CBRATEC8). Campos de Jordão, San Pablo, Brasil. Abril, 2012. Comunicación libre: Poster. Aloisio C., Gomes de Oliveira G., Longhi MR. "Estudio de complejos ternarios de sulfamerazina con ciclodextrinas y meglumine mediante análisis térmico".

Congreso XXI de la Federación Panamericana de Farmacia, XVI de la Federación Farmacéutica Sudamericana, XXI Farmacéutico Argentino. Salta, Argentina. Octubre, 2013.

- Aloisio C; Gomes de Oliveira A ; Longhi MR.. Caracterización de microemulsiones biocompatibles para la vehiculización de fármacos hidrofóbicos.
- Aloisio C; Gomes de Oliveira A ; Longhi MR. Complejos binarios de fármacos hidrofóbicos modelos incorporados a microemulsiones.

NACIONALES

XVII Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO). Carlos Paz, Argentina. Noviembre, 2011. Comunicación libre: Poster. Aloisio C., Gomes de Oliveira G., Longhi MR. "Estudio de la incorporación de fármacos hidrofóbicos modelos en microemulsiones".

VI Congreso Argentino de Química Analítica. Santa Fe, Argentina. 2011. Claudia Garneró, Carolina Aloisio y Marcela Longhi. Comunicación libre: Poster. "Estudio de la Influencia de la Formación de Complejos sobre el Reconocimiento Enantiomérico de Ibuprofeno".

PERÍODOS DE PERMANENCIA EN LAS UNIVERSIDADES PARTICIPANTES

DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

En la presente institución se realizaron tareas de investigación, fundamentalmente en los estudios de desarrollo, caracterización y ensayos de solubilidad de los complejos binarios y ternarios de SMR e INM con CD y/o MEG y fueron llevados a cabo los estudios de desarrollo, validación y determinación de permeabilidad *in vitro*, bajo la dirección de Dra. Marcela R. Longhi.

Períodos:

19 de Noviembre 2009 al 23 de Marzo de 2010.

31 de Mayo de 2010 al 24 de Enero de 2011.

18 de Marzo de 2011 al 05 de Febrero de 2012.

07 de Abril de 2012 al 23 de Octubre de 2013.

23 de Diciembre de 2013 al 08 de Febrero de 2014.

DEPARTAMENTO DE FÁRMACOS Y MEDICAMENTOS, FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, UNIVERSIDAD ESTADUAL PAULISTA (UNESP) “JULHO DE MESQUITA FILHO”, ARARAQUARA.

En la presente institución se realizaron tareas de investigación, fundamentalmente concernientes a los estudios de desarrollo, caracterización e incorporación de fármacos en microemulsiones y fueron llevados a cabo los estudios de Liberación *in vitro*, bajo la dirección de profesor Dr. Anselmo Gomes de Oliveira y bajo la Co-Dirección de la Profesora Dra. Palmira Daflón Gremião.

Períodos:

24 de Marzo al 30 de Mayo, 2010.

25 de Enero al 17 de Marzo, 2011.

06 de Febrero al 06 de Abril, 2012.

24 de Octubre al 23 de Diciembre, 2013.

09 de Febrero al 17 de Junio, 2014.

Financiado por: Programa de Centros Asociados CAPES/SPU.

ESTANCIAS EN OTRAS UNIVERSIDADES

Facultad de Farmacia, Universidad de Patras, Grecia

En la presente institución se realizaron estudios concernientes a la Incorporación de complejos de fármacos con ciclodextrinas y meglumine en liposomas para mejorar la biodisponibilidad de fármacos hidrofóbicos, en el marco de una estancia de Doctorado Sandwich, bajo la dirección de la Dra. Sophia Antimisiaris.

Periodo: 02 de Octubre de 2012 al 02 de Abril del 2013.

Financiado por: Programa “EuroTANGO II”, Erasmus Mundus Action 2-Strand 1, Coordinado por la Universidad Politécnica de Valencia, financiado por la Comisión Europea y gestionado por la EACEA.

